

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Inmunología



TESIS DOCTORAL

Cuantificación de alérgenos de *poaceae*, *oleaceae*, *platanaceae* y *cupressaceae* en la atmósfera de Madrid y su correlación con los recuentos de pólenes y las variables meteorológicas y de contaminación (2009-2010)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Martha Cabrera Sierra

Director

José Luis Subiza Garrido-Lestache

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-0623-3

© Martha Cabrera Sierra, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

**CUANTIFICACIÓN DE ALERGENOS DE *POACEAE*,
OLEACEAE, *PLATANACEAE* Y *CUPRESSACEAE* EN
LA ATMÓSFERA DE MADRID Y SU
CORRELACIÓN CON LOS RECuentOS DE
PÓLENES Y LAS VARIABLES METEOROLÓGICAS
Y DE CONTAMINACIÓN (2009-2010)**

DIRECTOR: JOSE LUIS SUBIZA GARRIDO-LESTACHE

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL DE MARTHA CABRERA SIERRA

Departamento de Inmunología

Madrid, 2011

A mis hijos: Rodrigo y Cecilia, mis dos amores.

A mis padres: Lite y Martha Cecilia.

A mis hermanos: Ernesto, Elizabeth, María Teresa y Olga Lucía.

Agradecimientos

Ha llegado la hora de la culminación de una ilusión que, desde siempre, ha sido uno de mis grandes retos como médico especialista en Alergología y que por circunstancias de la vida, ha sido difícil conseguir. Ahora que ve la luz, me llena de satisfacción por el trabajo realizado y por lo mucho que he aprendido con ella. El camino ha sido largo y duro.

Mi agradecimiento al Dr. José Luis Subiza, Director de Tesis y a su hermano, el Dr. Javier Subiza que me transmitió su buen hacer en la Aerobiología y en el seguimiento clínico de los pacientes con polinosis.

A la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica que siempre me apoyó, habiendo concedido en dos ocasiones, financiación a través de las Becas de su Fundación, y en nombre propio a Carmen Gutiérrez que desde la Secretaría Técnica me ha dado toda la asistencia que precisaba.

A Laboratorios Inmunotek por haberme facilitado la realización de la extracción y cuantificación de los alergenos y en nombre propio a Enrique Fernández-Caldas, Jose Ignacio Tudela y a Bárbara Cases.

A la Dra. Consuelo Martínez-Cócera, Jefa del Servicio de Alergología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid donde me formé como Alergóloga, por su apoyo.

A la Dra. Stella Moreno Grau de la Universidad Politécnica de Cartagena, por prestarme el Ciclón Burkard para la puesta en marcha del estudio y por toda su asesoría en cuanto a la valoración de la meteorología y la contaminación.

A la Dra. Maruxa Cervera Suárez de la Universidad Autónoma de Barcelona que creyó en mí y me transmitió el entusiasmo para seguir adelante.

A la empresa Bial-Aristegui de Bilbao y, dentro de ella a Juan Andrés Asturias por la asistencia técnica en relación con materiales y métodos relacionados con la inmunodetección de alergen.

A María José Narganes, de la Clínica Subiza, por ayudarme día a día en la recolección de las muestras.

A la Agencia Española de Meteorología y a la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid por facilitarme los datos meteorológicos y de contaminación respectivamente.

A Pipo y Pauline, por animarme a no perder mi ilusión.

A mis compañeros de San Camilo: Elías, Josefina, Magdalena, Marta, Adelaida, Jose Carlos, Jose Luis, Puri, Cristina, Sonia, Ángel, Rosa, Ezequiel, Jose Antonio y demás médicos y enfermeros que me ayudaron a compaginar mi trabajo y estudios y desde la distancia a otros compañeros de proyectos como Luis, Carlos, Eva, Miguel Ángel, Adolfo, Javier, Arturo, Francisco Javier y Juan Carlos, que siempre desearon que mi Tesis viera la luz.

RESUMEN

Se ha demostrado que los síntomas de los pacientes sensibilizados a pólenes se correlacionan con el respectivo recuento de granos. Sin embargo, diferentes estudios han confirmado la presencia de actividad alérgica aerovagante fuera del periodo de polinización.

Por ello, se ha sugerido que el recuento de pólenes no contempla el total de la exposición alérgica. Este hecho indica que existen otras fuentes de alérgenos además de los granos de polen, pudiendo constituir una carga alérgica relevante.

Los métodos inmunoquímicos para valorar la exposición alérgica tienen en cuenta la contribución de alérgenos con reactividad cruzada y otras fuentes de alérgenos en partículas micrónicas.

Las técnicas de muestreo cuantitativo de granos de polen nos han llevado a conocer mejor la distribución e importancia clínica de estos alérgenos naturales. En Madrid, atendiendo a los taxones de mayor relevancia clínica en el área geográfica de Madrid, para facilitar su comprensión se ha dividido el año en 4 periodos: Noviembre-Marzo, donde se detectan en la atmósfera fundamentalmente pólenes de Cupressaceae; Abril prevalece el plátano de sombra, Mayo y Junio fundamentalmente Poaceae y Oleaceae y Julio-Octubre las Quenopodeáceas-Amarantáceas.

A pesar de que generalmente se relaciona el comienzo y la gravedad de las manifestaciones alérgicas respiratorias con la aparición y persistencia en el aire de los diferentes tipos de granos de polen o tipos polínicos, un parámetro mucho más relevante es conocer la cantidad real de alérgeno presente en la atmósfera en un momento determinado.

El significado clínico de pequeñas partículas portadoras de alérgenos de plantas ha generado un debate importante en los últimos años. La existencia de estas partículas alérgicas se ha demostrado para diversos grupos de plantas. Estas pueden ser detectadas

antes de la estación polínica y pueden persistir después de la polinización, contribuyendo a la carga total de alérgenos.

Estas partículas alérgicas se encuentran dentro de las dimensiones respirables, de tal manera que pueden penetrar profundamente en la vía aérea y provocar una crisis de asma. Sin embargo, poco se sabe sobre su prevalencia en la atmósfera, su variación geográfica y temporal y su composición química detallada.

De forma similar, el origen exacto de este aerosol atmosférico es desconocido pero se han propuesto varios mecanismos, interviniendo como variables la climatología, el hábitat y la contaminación:

- Reactividad cruzada entre pólenes relacionados o no taxonómicamente
- Contribución de otras partes de la planta como hojas y tallos
- Gránulos de almidón procedentes de granos de polen liberados en condiciones de humedad tras su ruptura
- Orbículos procedentes del revestimiento de las anteras y del propio grano de polen
- Alérgenos transportados en los mismos granos de polen
- Alérgenos transportados por partículas formadas de forma natural en el ambiente (microgotas de agua)
- Alérgenos transportados por partículas de la contaminación

Aunque el recuento de granos de polen es una herramienta de trabajo imprescindible para los alergólogos, ya que permite confirmar o identificar los tipos causantes de polinosis en cada una de las áreas geográficas, las evidencias señaladas llevaron, ya en el año 1994, a Rantio-Lehtimäki et al., a precisar que los hechos descritos anteriormente demandaban un esfuerzo a los aerobiólogos, encaminado al desarrollo de nuevos métodos para la cuantificación de los aeroalérgenos presentes en el aerosol atmosférico.

En los últimos años, uno de los campos más atractivos de investigación básica en alergología es el relacionado con la técnicas de muestreo y detección inmunoquímica de pequeñas partículas en la atmósfera para la cuantificación de su actividad alérgica, con el

fin de conocer la carga total de alérgenos frente a la cual están expuestos los pacientes sensibilizados y para el desarrollo de un método rápido y asequible que pueda ser aplicado rutinariamente para complementar la información del recuento de polen. Esto es especialmente importante en los días húmedos cuando el recuento de polen no da una buena indicación del contenido alérgico del ambiente.

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

- Cuantificar la presencia de actividad alérgica dependiente de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* en la atmósfera de Madrid y establecer sus relaciones con el respectivo recuento atmosférico de granos de polen.
- Valorar la influencia de las variables meteorológicas y de contaminación sobre los alérgenos.

Tras una exhaustiva revisión de la literatura existente en torno al polen y los alérgenos de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* y los efectos de las variables meteorológicas y de contaminación sobre los mismos, así como por las principales técnicas de captura y valoración se describen las técnicas inmunológicas y se detallan los materiales empleados y los métodos seguidos para la obtención de los resultados presentados.

En el estudio se han utilizado captadores aerobiológicos de bajo volumen. Para la caracterización aerobiológica clásica se ha utilizado un captador Burkard, mientras que para la identificación y cuantificación de Phl p1, Phl p 5, Ole e 1, Pla a 1 y Cup a 1, se ha utilizado un captador ciclónico Burkard. Las muestras para los recuentos de los respectivos taxones se han procesado siguiendo las instrucciones del Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica. Los alérgenos se han cuantificado por técnicas inmunoanalíticas tras la extracción de las muestras.

En el capítulo siguiente se presentan los resultados obtenidos:

En general, podemos afirmar que en las muestras cuando se produce un incremento en los recuentos de granos de *Poaceae*, *Oleaceae* y *Platanaceae*, se produce también un incremento en las concentraciones de los alérgenos. Solo para el año 2010, el

comportamiento de los alérgenos de Platanaceae respecto a su respectivo recuento de pólenes difiere del encontrado en 2009. Su comportamiento para el año 2009, así como el de *Poaceae* y *Oleacea* en 2009 y 2010 presentan unos coeficientes de correlación muy altos con su correspondiente recuento de granos de polen, atendiendo al PPP de cada uno de ellos así como para el año completo (Phl p 1, r: 0,63; Phl p 5, 0,70, Ole e 1, r: 0,84, Pla a 1, r: 0,62), estadísticamente significativos $p=0,00001$.

Así, para 2009 y 2010 se han encontrado buenos paralelismos entre el comportamiento de los recuentos de los granos de polen y los de aeroalérgeno en las 284 muestras obtenidas, excepto para Platanaceae en 2010 con un coeficiente de correlación más bajo pero significativo (Pla a 1, r: 0,41, $p=0,0001$).

Para los pólenes de *Poaceae* y la presencia de Phl p1 y Phl p 5 durante el año 2009, el día pico de alérgenos se detectó el 19 de mayo (73 granos/ m^3/d Phl p1 15,79 ng / m^3 , p Phl 5: 0,24 ng / m^3) y durante el año 2010 el 24 de mayo (324 granos/ m^3/d y Phl p1 38,9 ng/ m^3 , p Phl 5: 1,56 ng / m^3). Se detectaron más altos niveles de polen durante el año 2010, de forma significativa (del 19 de abril al 27 de julio: media de polen de 40 granos/ m^3/d) frente a 2009 (desde 23 de marzo al 17 de julio, con una media de polen de 19 granos/ m^3/d), r: 0,33, $p<0,001$).

Para Ole e 1 el pico de alérgenos durante 2009 se detectó el 20 de mayo (520 granos/ m^3/d , Ole e 1: 5,69 ng / m^3) y durante 2010 el 1 de junio (250 granos/ m^3/d , Ole e 1: 3,78 ng/ m^3). Se objetivaron niveles de pólenes de Oleaceae más altos en 2009 (5 de mayo al 16 junio, con una media de polen: 95 granos/ m^3/d) frente a 2010 (del 19 mayo al 30 de junio, con una media de polen de 19 granos/ m^3/d), r: -0,14, $p<0,001$).

Para Pla a 1, existe una correlación con los granos de polen de $r = 0,41$, $p < 0,001$. El pico de alérgenos durante 2010 se detectó el 7 de abril (762 granos/ m^3/d ; Pla de 1: 0.35 ng/ m^3), habiéndose extendido la estación desde el 5 de abril al 16 mayo con una media de 230 granos/ m^3/d .

Respecto a Cup a 1, los resultados se encuentran por debajo del límite de detección de la técnica, por lo que no se han podido cuantificar. Respecto al periodo de polinización 2009-

2010, se extendió desde el 24 de diciembre al 27 de marzo, con 37 granos/m³/d de media diaria.

Se valora además la influencia de las variables meteorológicas y de contaminación, procediendo a su discusión.

La cuantificación de los alérgenos suministró una información similar a la aportada por los recuentos tradicionales de pólenes, y por ello consideramos que la cuantificación en el aerosol atmosférico de la carga alérgica transportada puede ser una buena aproximación desde la aerobiología al conocimiento de su reactividad y respuesta, constituyendo datos de interés en los estudios epidemiológicos.

Complementa la discusión el capítulo de conclusiones, en el que se recogen un total de ocho aportaciones conseguidas con este estudio y se proponen las líneas de futuro en la investigación. La memoria finaliza con una extensa relación de toda la bibliografía que se ha utilizado para la realización del trabajo.

SUMMARY

It has been shown that the symptoms of patients sensitized to pollens are correlated with the respective grain counts. However, different studies have confirmed the presence of allergenic activity outside the pollination period. Therefore, it has been suggested that the pollen count does not include the total allergen exposure. This suggests that other sources of allergens, in addition to the pollen grains, may constitute a relevant allergen load.

Immunochemical methods to assess allergen exposure take into account the contribution of cross-reactive allergens and other sources of particulate material.

Quantitative pollen grain sampling techniques have led to a better understanding of the distribution and clinical significance of these natural allergens. In Madrid, taking the most clinically relevant taxa, the year is divided into four periods: from November to March, with the appearance of *Cupressaceae* pollens in the atmosphere; April, with the prevalent *Platanaceae*; May and June mainly with *Poaceae* and *Oleaceae*; and from July to October with *Chenopodium-Amaranthaceae*.

Although the onset and severity of respiratory allergic symptoms is normally linked to the appearance and persistence in the air of different types of pollen, a more relevant parameter is the amount of allergen present in the atmosphere at any given time.

The clinical significance of small allergen-carrying plant particles has generated considerable debate in recent years. The existence of these allergen particles has been shown in various groups of plants. These can be detected before the pollen season and may persist after pollination, contributing to the overall allergen burden.

These are of respirable size so that they can penetrate deep into the airways and cause an asthma attack. However, little is known about the prevalence of these particles in the atmosphere, their geographical and temporal variations and detailed chemical composition.

Similarly, their exact origin is unknown but several mechanisms have been proposed, including weather, habitat and pollution:

- Cross-reactivity between taxonomically related or unrelated pollens
- Input from other plant parts such as leaves and stems
- Starch granules from pollen grains released in wet conditions after break-up
- Orbicularis from the lining of the anthers
- Allergens shipped in the same pollen
- Allergens carried by particles formed by natural phenomena in the environment (water droplets)
- Allergens carried by pollution particles

These findings, together with other scientific evidence, the lack of relationship found between pollen counts and asthma, and the controversy about the size of pollen grains and their ability to penetrate deep into the respiratory system, have led to the concept of allergen load and to a consideration of the need to quantify the allergen load also in the atmospheric aerosol.

Although the pollen count is an essential tool for allergists, to confirm or identify the types of pollens that cause pollinosis in each geographical area, the evidence led Rantio-Lehtimäki et al., (1994) to specify that the events described above required research aimed at developing new methods to quantify the aeroallergens present in the atmospheric aerosol.

In recent years, one of the most attractive fields of basic research in allergy is related to the sampling techniques and immunochemical detection of small particles in the atmosphere to quantify allergenic activity and determine the total allergen load to which patients are exposed and sensitized, to develop a fast and affordable method that can be applied routinely to complement the pollen count information. This is especially important on wet days when the pollen count does not give a true indication of the allergen content of the atmosphere.

The objectives of this study are to:

- Quantify the presence of *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* and *Cupressaceae* allergenic activity in the atmosphere of Madrid and establish their relationships with the respective atmospheric pollen grain counts.
- Assess the influence of weather and pollution variables on allergens.

A review of the literature on the pollen and allergens from *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* and *Cupressaceae*, pollutant and meteorological data, the main capture and assessment techniques and immunological techniques leads to a description and listing of the materials and methods used to obtain the results presented.

The study used low-volume aerobiological collectors. To characterize pollen counts and aeroallergens load (Phl p1, Phl p 5, Ole e 1, Pla a 1 and Cup a 1), the classical Burkard and Burkard cyclonic collectors, respectively, were used. Pollen identification was conducted by expert technicians and was based on comparison with reference slides and photographs, as described by Hyde and Adams following the instructions of the Aerobiology Committee of the Spanish Society of Allergology and Clinical Immunology. The allergens were quantified by immunological techniques after extraction of the samples.

The next chapter presents the results obtained:

In general, the samples show that when there is an increase in *Poaceae*, *Oleaceae* and *Platanaceae* pollen grain counts, there is also an increase in the allergen concentrations.. Only in the year 2010, the behavior of *Platanaceae* allergens compared to their respective pollen count differs from that found in 2009. *Platanaceae* allergens in 2009 and the *Poaceae* and *Oleaceae* allergens in 2009 and 2010, showed very high correlation coefficients with the corresponding pollen grain counts, considering the principal pollination period for each one of them and for the whole year.

Thus, for 2009 and 2010 a high correlation is found between the behavior of the pollen grain counts and of aeroallergens in the 284 samples taken, except for *Platanaceae* in 2010

with a lower but still significant correlation coefficient (Platanus 1, $r = 0.41$, $p = 0.001$).

Analysis of the data using the Pearson rank test showed a good correlation between Poaceae pollen grains and Phl p1 and Phl p 5 levels ($r=0.63$ and 0.70 , respectively, $p < 0.00001$) throughout the study period. Main allergenic activity in 2009 was detected on May 19th (pollen count: 73 grains/m³; Phl p 1: 15.79 ng/m³ and Phl p 5: 0.24 ng/m³) and in 2010 on May 24th (pollen count: 324 grains/m³/d, Phl p1: 38,9 ng/m³ and Phl p 5: 1,56 ng/m³). Significantly higher pollen levels were detected during the 2010 pollen season (from April 19th to July 27th, mean pollen counts: 40 grains/m³/d) versus 2009 (from March 23rd to July 17th, mean pollen counts: 19 grains/m³/d), $r = 0.33$, $p < 0.001$.

For Olea 1, data by the Pearson rank test showed a good correlation between these two variables ($r = 0.70$, $p < 0.0001$). Before the *Oleaceae* pollen season, low allergen quantities were detected, which could be due to *Fraxinus excelsior* pollination. The main allergenic activity in 2009 was detected on May 20th (pollen count: 520 grains/m³/d and Olea 1: 5,69 ng/m³) and in 2010 on June 1st (pollen count: 250 grains/m³/d and Olea 1: 3,78 ng/m³). Significantly higher pollen and allergen levels were detected during the 2009 pollen season (from May 5th to June 16th, mean pollen counts: 95 grains/m³/d) versus 2010 (from May 19th to June 30th, mean pollen counts: 19 grains/m³/d), $r = 0.14$, $p < 0.001$.

For *Platanaceae*, the data analysis showed a correlation between pollen grains and Platanus 1 of $r=0.41$; $p < 0.001$. Main allergenic activity during 2010 was detected on April 7th (pollen count: 762 grains/m³/d; Platanus 1: 0,35 ng/m³). The pollen season lasted from April 5th to May 16th. The mean pollen count was 230 grains/m³/d.

Detection of Cupressus 1, was below the detection limit of the technique and could not be observed. The pollination period 2009-2010 lasted from December 24th to March 27th with 37 grains/m³/d.

The influence of weather and pollution variables was considered and is detailed in the discussion section.

The quantification of allergens provided similar information to that provided by traditional pollen counts, and therefore it is considered that the quantification of the atmospheric aerosol allergen load can be a good approach from the aerobiological knowledge of their reactivity and response and will provide useful information for epidemiological studies.

The discussion is complemented with the concluding chapter, which includes eight basic ideas arising from this research and which provide themes for future research. The report concludes with an extensive bibliography of all the literature consulted.

INDICE

INTRODUCCIÓN.

1. FUNDAMENTOS DE LA AEROBIOLOGIA Y EMISIÓN DE PÓLENES Y PARTÍCULAS MICRÓNICAS.

1.1. Aerobiología y polinosis.....	21
1.1.1. Dinámica de las partículas en el aire.....	23
1.1.2. Dinámica de las partículas en la vía respiratoria.....	23
1.1.3. Alergenos en relación con sus fuentes.....	24
1.1.4. Historia de la polinosis.....	25
1.1.5. Consideraciones generales sobre los pólenes.....	26
1.1.6. El grano de polen	27
1.1.7. Ontogenia de los granos de polen y evolución de las células del tapete....	28
1.1.8. Polinosis.....	33
1.1.9. Papel de los pólenes en la patogenia de la rinitis y el asma.....	34
1.1.10. Relaciones entre exposición alérgica y síntomas en los pacientes con polinosis.....	34
1.1.11. Identificación de los alergenios polínicos.....	35
1.1.12. Objetivos de la monitorización de aeroalergenios.....	36
1.1.13. Influencia de las variables meteorológicas sobre la floración, polinización y espectro polínico.....	38
1.2. Áreas aerobiológicas en España.....	39
1.2.1. La España verde.....	40
1.2.2. La España seca.....	40
1.2.2.1. La España seca estrecha costera.....	41
1.2.2.2. La España seca de clima continental.....	41
1.3. Aerobiología del área geográfica de Madrid.....	42

1.4. Relevancia aerobiológica y clínica de las gramíneas en el área geográfica de Madrid.....	45
1.5. Origen y significado de partículas micrónicas dependientes de plantas.....	46
1.5.1. Alergenos de pólenes en partículas micrónicas.....	46
1.5.2. Posibles fuentes.....	47
1.5.3. Partículas alérgicas y recuentos de pólenes. Algunas relaciones básicas.....	50
2. ALERGIA Y CONTAMINACIÓN.....	51
2.1. Efectos de la contaminación sobre los alérgenos.....	53
2.2. Papel del diesel en la polinosis.....	55
3. METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN INMUNO-QUÍMICA DE AEROALERGENOS.....	56
3.1. Técnicas utilizadas para verificar la presencia de aeroalérgenos procedentes de pólenes en partículas micrónicas.....	58
3.1.1. Captación de partículas micrónicas. Ciclón Burkard.....	58
3.1.2. Cuantificación de alérgenos en partículas micrónicas.....	60
3.1.2.1. Alergenos recombinantes.....	63
3.1.2.2. Fuente de anticuerpos.....	67
3.1.2.3. Inmunodetección de alérgenos.....	67
3.1.3. Necesidades actuales en el estudio de partículas micrónicas.....	69
4. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	69
5. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	71
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
6.1 Recuento de pólenes.....	73
6.2 Captador de bajo volumen. Burkard ciclón.....	74

6.3 Cuantificación de alergen Phl p 1, Phl p 5, Ole e 1, Pla a 1 y Cup a 1.....	75
6.3.1 Extracción de los alergen de las muestras.....	76
6.3.2 Tampón de extracción.....	76
6.4 Estándar para ELISA del alergen purificado.....	77
6.5 Anticuerpos monoclonales y antisueros policlonales.....	77
6.6 ELISA doble fase. Protocolo.....	80
6.7 Obtención de los datos de meteorología y contaminación.....	83
6.8 Tratamiento estadístico de los datos.....	83
 7. RESULTADOS.....	 84
7.1 Curvas de calibración para la cuantificación de alergen.....	84
7.2 Cuantificación de alergen versus el correspondiente recuento de polen.....	94
7.3. Datos aerobiológicos de <i>Poaceae</i> , <i>Oleaceae</i> , <i>Platanaceae</i> y <i>Cupressaceae</i> en la atmósfera de Madrid en el periodo 2009-2010.....	98
7.3.1 Evolución de las <i>Poaceae</i> , <i>Oleaceae</i> , <i>Platanaceae</i> y <i>Cupressaceae</i> durante el periodo de estudio 2009-2010.....	98
7.3.2 Tablas valores acumulados anuales.....	99
7.3.3 Caracterización del Periodo Principal de Polinización (PPP) y días pico.....	100
7.4 Temperatura, humedad relativa, dirección del viento y velocidad del viento en Madrid. Durante el periodo des estudio 2009-2010.....	102
7.5 Datos de contaminación en Madrid durante el periodo de estudio 2009-2010: SO ₂ , NO ₂ , PM10 y O ₃	103
7.6 Datos de contaminación en Madrid durante el periodo de estudio 2009-2010 benceno y monóxido de carbono	105
7.7 Correlaciones entre las variables granos de polen, alergen y variables meteorológicas y de contaminación.....	106

8	DISCUSIÓN.....	113
8.1	Puesta a punto del ELISA doble sándwich y hallazgos comparativos con otros estudios que utilizaron la misma técnica.....	115
8.2	Variaciones anuales en las concentraciones de pólenes.....	117
8.3	Comportamiento aerobiológico de los granos de pólenes de <i>Poaceae</i> , <i>Oleaceae</i> , <i>Platanaceae</i> y <i>Cupressaceae</i> y sus respectivos alérgenos, durante el periodo de estudio 2009-2010.....	119
8.4	Mecanismos de liberación de partículas micrónicas asociadas a pólenes.....	125
8.5	Comparación con metodología de otros estudios.....	128
8.5.1	Captadores.....	128
8.5.2	Inmunoensayo.....	131
8.5.3	Tabla resumen de algunos estudios.....	132
8.6	Efectos de las variables meteorológicas y contaminación sobre la presencia de alérgenos.....	139
8.7	Perspectivas de futuro.....	148
9	CONCLUSIONES.....	150
10	BIBLIOGRAFÍA.....	152

INTRODUCCIÓN

1 Fundamentos de la aerobiología y emisión de pólenes y partículas micrónicas

1.1 Aerobiología y polinosis

La aerobiología, se ocupa del origen, liberación, transporte, depósito y efecto de las partículas biológicas transportadas por el aire, por lo que es, esencialmente, una ciencia multidisciplinaria (1). En consecuencia, los métodos actuales para estudiar los alérgenos inhalantes reflejan la contribución realizada por biólogos, agrónomos y médicos, entre otros (2). Esta diversidad y la oportunidad de satisfacer intereses con la historia natural han hecho que este campo tenga un atractivo especial para muchos profesionales.

El valor de tener una idea sobre la prevalencia de las partículas específicas transportadas en el aire se hizo evidente para los primeros investigadores en el campo de la alergia humana, de modo que se han venido realizando estudios aerométricos desde hace ya un siglo (3).

En el ámbito de la aerobiología se distinguen 3 fases: la liberación o lanzamiento, la permanencia en el aire y transporte a través del mismo, y el depósito de las partículas biológicas. También incluye las fuentes y productos que preceden a la liberación y los efectos que aparecen después del depósito.

La primera fase de la polinización es la liberación de granos de polen, en la que desempeñan un papel los mecanismos de lanzamiento tanto activos como pasivos. Estos mecanismos permiten que los granos de polen atraviesen la llamada capa limítrofe de aire que rodea a las anteras. Este lanzamiento es un proceso que consume energía en el que participan a menudo ráfagas de corriente de aire, aunque en ocasiones son esenciales los mecanismos de tipo catapulta, desencadenados por los cambios de temperatura o de humedad (4). Este proceso de liberación y lanzamiento del polen puede diferir considerablemente entre las diversas plantas. Por consiguiente, algunos tipos de polen son liberados en las primeras horas de la mañana después del primer descenso de la humedad del aire, mientras que otros tipos precisan un periodo de calentamiento solar. Para algunos

tipos de polen, las corrientes de aire son esenciales mientras que otros son lanzados por el mecanismo de catapulta.

El tiempo y la proporción de la permanencia de las partículas en el aire y su transporte a través del mismo, característicos de la segunda fase de la vía aerobiológica, dependen considerablemente de la presencia y la fuerza de la turbulencia del aire. En ausencia de turbulencia todas las partículas caerán al suelo por la acción de la gravedad. Las partículas muy pesadas caerán mucho más rápidamente que las partículas ligeras. Las partículas con tamaños aerodinámicos de 20-40 μm , que corresponden a numerosos granos de polen, caerán con velocidades de 3,5 cm/segundo. Esto significa que con el aire en calma, los granos de polen caerán al suelo con bastante rapidez y para una permanencia prolongada en el aire es imprescindible la presencia de turbulencia. Así, los granos de polen son aerotransportados durante algún tiempo, a menos que la presencia de lluvia y otras influencias los eliminen del aire.

Todas las partículas aerotransportadas se depositarán sobre algún tipo de sustrato. Los tres mecanismos principales de depósito son: la sedimentación (caída) por gravitación, el impacto de las corrientes de aire sobre obstáculos por inercia y, en el caso de las partículas más pequeñas, la colisión al azar por difusión (movimiento browniano). La sedimentación tiene una gran importancia para el depósito de las partículas más grandes, que apenas penetrarían en la vía respiratoria, independientemente de la presencia de una turbulencia o de corrientes de aire. En ausencia de turbulencia, la sedimentación desempeña también un papel determinante en el depósito de las partículas más pequeñas en las partes más profundas de la vía respiratoria. El impacto es el mecanismo principal del depósito efectivo de las partículas de tamaño medio cuando una corriente de aire topa con un obstáculo; por inercia las partículas no seguirán el cambio de la corriente de aire.

Las partículas más pequeñas, de tamaños inferiores a 3 μm , no se depositan rápidamente desde el aire. Poseen una velocidad de caída baja y una inercia reducida que evitan una sedimentación y un impacto efectivos. Estas partículas pequeñas permanecen en el aire durante periodos bastante prolongados y también penetran profundamente en la vía respiratoria de donde vuelven a ser expiradas en su inmensa mayoría. En el depósito al azar de las partículas más pequeñas, puede tener importancia la colisión con cualquier sustrato a través del movimiento browniano.

1.1.1 Dinámica de las partículas en el aire

Las partículas en suspensión experimentan continuamente aceleraciones verticales y horizontales ejercidas por una atmósfera móvil y, una vez en movimiento, tienden a desplazarse siguiendo trayectorias rectas. Sin embargo, sus trayectorias lineales se modifican tanto por la fuerza de la gravedad y la fricción con moléculas de aire como por los cambios continuos de velocidad del medio gaseoso. Estas fuerzas hacen que la trayectoria de las partículas se desvíe de las corrientes de aire que las transportan, un efecto explotado por todas las técnicas de recolección en las que los aerosoles se depositan o colisionan en superficies preparadas (3). La colisión de aerosoles aerotransportados se determina en gran parte por la velocidad del aire, el tamaño de las partículas y el tamaño del obstáculo fijo. Los dispositivos mecánicos de muestreo promueven este proceso acelerando activamente el aire mediante las trompas de succión.

1.1.2 Dinámica de las partículas en las vías respiratorias

En las vías aéreas hasta los bronquiolos terminales el gas se moviliza predominantemente en forma de caudal masivo, como el agua por una manguera de riego. Sin embargo, dado que el mismo volumen de gas atraviesa cada generación del árbol bronquial, implica que la velocidad de avance del gas inspirado decrece rápidamente cuando el gas penetra en la zona respiratoria. En efecto, la velocidad llega a ser tan pequeña que comienza a predominar otra modalidad de caudal. Esta es la difusión gaseosa debida al movimiento al azar de las moléculas. La velocidad de la difusión de las moléculas es tan rápida y la distancia que deben cubrir tan corta (apenas algunos mm) que las diferencias de concentración a lo largo de las vías aéreas terminales son virtualmente anuladas en un segundo. Sin embargo, las partículas inhaladas de polvo se difunden muy lentamente por su tamaño relativamente grande y por lo tanto no llegan a los alvéolos sino que se depositan en la región de los bronquiolos respiratorios.

La deposición de partículas en al vía aérea no está sólo determinada por estas propiedades aerodinámicas, sino también por el rango de flujo aéreo y los patrones de respiración.

1.1.3 Alergenos en relación con sus fuentes:

Con frecuencia es útil diferenciar dos grupos de alergenios inhalantes:

- Los derivados de fuentes naturales (4) y
- Los generados por la actividad doméstica o profesional humana (5).

Esta distinción tiene una validez clínica, teniendo en cuenta que la evitación de alergenios redundaría en el mejor control de la enfermedad. Además, la actividad humana influye en gran manera en la intensidad y distribución de las fuentes de alergenios en la naturaleza.

Los factores determinantes de los aeroalergenios formados por partículas clínicamente relevantes presentan dos características esenciales:

- Grupos antigénicos específicos capaces de provocar respuestas reagénicas y
- Fuentes suficientemente importantes y mecanismos de transporte adecuados para alcanzar niveles de exposición que producen cambios histológicos en individuos sensibilizados.

Todavía no se han estudiado bien los niveles de prevalencia y los patrones de distribución de los aerosoles biológicos y, para muchas partículas, las respuestas reagénicas todavía no se han evaluado mediante pruebas directas. Incluso entre los alergenios transportados por el aire no se ha esclarecido aún el umbral de dosis-respuesta y, a partir de las observaciones clínicas es dudoso que muchas exposiciones naturales sean de hecho suficientes como para inducir síntomas o contribuir normalmente a la morbilidad (6). Los resultados de las pruebas de provocación con extractos de alergenios no han resuelto por completo estos problemas debido a las dosis desencadenantes aplicadas en los métodos convencionales de exposición de las mucosas (7).

1.1.4 Historia de la polinosis

La primera definición científica de la polinosis fue realizada por el Dr. Bostock en 1819 (8). En un trabajo que leyó en la Sociedad Médico-Quirúrgica de Londres, titulado "Un caso de una afección periódica de los ojos y el tórax", describió su propia enfermedad, consistente en un proceso "catarral" que a diferencia de la coriza común, solamente se producía durante la estación del heno en Inglaterra "Junio y Julio" denominándolo por ello fiebre del heno. En 1828 el Dr. John Bostock pudo leer un segundo estudio que incluía 18 casos similares al suyo, algunos de ellos también acompañados de asma (asma del heno). Tuvieron que pasar más de 40 años para que otro médico inglés Charles Harrison Blackley publicara en su libro "Naturaleza y causa del catarro estival (fiebre del heno o asma del heno)", que la causa de esta enfermedad no era producida por los "efluvios del heno" sino por los pólenes, especialmente por los procedentes de las Poaceae. Blackley que fue realmente un adelantado para su tiempo, fabricó lo que sería un primer colector de pólenes, con la ayuda de una veleta. Incorporó en el centro de la misma un portaobjetos vertical que previamente había untado con vaselina y cada 24 horas lo desmontaba de la veleta. Mediante la ayuda de un microscopio, iba reconociendo y contabilizando los diferentes tipos de pólenes que habían quedado impactados. El pudo comprobar que en Manchester, durante los meses de Junio y Julio, precisamente la época en que sus pacientes de fiebre del heno tenían síntomas, aparecían importantes concentraciones atmosféricas de pólenes de Poaceae. También pudo comprobar que los síntomas de fiebre del heno podía desencadenarlos en su laboratorio, a los pocos minutos de hacer inhalar a sus pacientes granos de pólenes de Poaceae. Igualmente observó que éstos, a diferencia de las personas sanas, desarrollaban una respuesta de pápula y eritema a los pocos minutos de aplicarles pólenes de Poaceae sobre su piel previamente escarificada. El tiempo le ha dado la razón a Blackley, reconociéndose en la actualidad que los pólenes de Poaceae no solamente son la causa más importante de fiebre del heno en Inglaterra sino globalmente en todo el mundo, debido a su extensa distribución (20% de la masa vegetal) y a su gran alergenidad.

Aunque obviamente no son los únicos, también otros pólenes contribuyen de una forma importante en la polinosis, tal como el polen de Ambrosia (*Ambrosia trifida* y *Ambrosia artemisifolia*) que según Lewis WH (9), produce más síntomas de polinosis en Norteamérica que todos los demás pólenes juntos. Las mayores concentraciones se

obtienen en la mitad Este de Estados Unidos, durante los meses de agosto a octubre (10). En Europa la Ambrosia sólo produce síntomas de polinosis en el centro de Europa (Austria y países circundantes, norte de Italia, y sur de Francia) (11). En España se han detectado concentraciones pequeñas en Barcelona aunque sin evidencia todavía de polinosis. Otros pólenes importantes capaces también de producir rinitis y asma epidémico son el abedul (Mayo-Junio en la península Escandinava) (11), el cedro japonés (Mayo-Junio en Japón) (12), la parietaria (Marzo-Octubre litoral mediterráneo) (11), y el polen de Oleaceae (Abril-Junio en el sur de España y amplias zonas del litoral mediterráneo) (11).

1.1.5. Consideraciones generales sobre los pólenes

Los granos de polen son estructuras reproductoras masculinas de las plantas con semilla. Un grano de polen se compone de una cubierta externa (exina) formada por una sustancia de origen lipoidal llamada esporopolina, que resulta ser la sustancia de origen orgánico más resistente a los agentes químicos que se conozca. Debajo de la exina existe otra cubierta de composición más o menos celulósica (intina) muy similar a la pared de una célula vegetal y que está envolviendo tres células, una célula vegetativa y dos células espermáticas. Por tanto un grano de polen no es más que un receptáculo cuya función es transportar esos dos gametos masculinos, desde las anteras de una flor hasta los estigmas de otra para asegurar la fecundación del óvulo y formación del fruto. Los pólenes de relevancia clínica son por tanto los que están adaptados para poder producir una polinización a través del aire (anemófila) son pólenes pequeños (la mayoría entre 20-40 μm), ligeros y no adherentes (4).

En general el polen se disemina en las primeras horas de la mañana, pero la dispersión y la redistribución a lo largo del tiempo, determina en general concentraciones máximas en la ciudad por la tarde. La viabilidad del polen (capacidad de fecundar) es de tan sólo 2-4 horas pero esto no influye en su alergenidad. La naturaleza ligera del polen le permite que éste pueda ser transportado por el viento aún en presencia de brisas suaves y viajar varios kilómetros, lo que permite que incluso en lo más interior de las ciudades, puedan captarse altas concentraciones de pólenes, a pesar del efecto barrera que suponen los edificios altos. Las fuentes vegetales de polen aerovagante, incluyen plantas con flores poco llamativas sin pétalos ni nectarios, casi sin aroma, que contrastan con las flores vistosas y aromáticas de

las plantas entomófilas (polinización a través de insectos), que además producen un polen pesado y adhesivo. Aunque éstas apenas representan el 10% de las plantas, la cantidad de polen que es capaz de producir es prodigiosa (4).

La presencia en la atmósfera de pólenes de las Poaceae de crecimiento espontáneo (no cultivadas) es la causa más importante de fiebre del heno en España (y en casi todo el mundo) (8); en segundo lugar se encuentra el polen del Oleaceae en las zonas sur, centro y este de la península (8). El polen de parietaria (una maleza) también presenta una gran importancia pero sólo en la zona costera mediterránea. Otras plantas igualmente de polinización anemófila (a través del aire) tales como el plantago, artemisia, quenopodio, etc. o árboles tales como las Cupressaceae, plátano de sombra, abedul, pueden producir fiebre del heno, aunque globalmente su importancia en España es menor (8).

1.1.6. El grano de polen

El grano de polen constituye la espora masculina, o microspora, de las plantas con flores, que incluyen tanto gimnospermas como angiospermas. Es el vehículo de los gametos masculinos o de sus células progenitoras, por lo que contiene toda la información genética necesaria para la unión con el gameto femenino. El proceso reproductivo en las plantas es muy complejo y en él intervienen proteínas y enzimas características. Los granos de polen de gimnospermas y muchas angiospermas que son liberados en la atmósfera para la polinización anemófila, forman parte natural de la misma y pueden provocar polinosis y asma en personas sensibles. Por ello, es importante conocer no solo la distribución de los granos de polen en el aire y las características moleculares de los alérgenos que ellos contienen, sino también el papel que estas moléculas, altamente interactivas, juegan en el desarrollo y germinación del polen, para poder diseñar estrategias preventivas y curativas eficaces.

1.1.7. Ontogenia de los granos de polen y evolución de las células del tapete

El proceso ontogénico del grano de polen o gametogénesis masculina, comienza en el saco polínico de la antera con la división de unas células esporofíticas diploides que reciben el nombre de células madres. La pared del saco polínico está formada por cuatro capas: epidermis, endotecio, capa intermedia y tapete. La capa mas interna es el tapete que constituye un tejido directamente implicado en la formación de los granos de polen.

Al inicio del proceso, las células madres se rodean de una envuelta especial de calosa (1-3, β glucano) que les proporciona un aislamiento parcial ya que permite el paso selectivo de moléculas provenientes del tapete. Cada una de las células madres experimenta una división meiótica; como resultado de la cual se forma una tétrada haploide, que se mantiene unida durante un tiempo por la envuelta de calosa. Seguidamente, y gracias a la acción de una calasa producida por las células del tapete, la pared de calosa se disuelve y las microsporas quedan libres en el lóculo del saco polínico. Al mismo tiempo, durante esta secuencia se va depositando la pared del grano de polen, mediante la influencia directa de las células del tapete. Las microsporas experimentan una transformación continuada en su contenido citoplasmático, sufriendo una mitosis que da lugar a dos células: una responsable de la fecundación (célula generativa) y otra de la nutrición (célula vegetativa).

Durante el desarrollo de los granos de polen se establece un patrón de organización de la pared polínica, esporodermis, básicamente relacionado con la posición de las aperturas y estratificación y ornamentación de las dos capas principales: la exina, o capa más externa, formada a su vez por dos subcapas, ectexina y endexina y la intina o capa mas interna. La diversidad y complejidad de la pared polínica está directamente relacionada con las numerosas funciones que ésta tiene que llevar a cabo: proporciona protección física al contenido citoplasmático, determina las rutas de transferencia de agua y participa en el transporte de proteínas y enzimas involucradas en la interacción entre el polen y la superficie estigmática. Por otra parte, presenta una estructura muy elaborada, con un diseño específico, determinado genéticamente, que aporta caracteres taxonómicos de gran utilidad en el reconocimiento de los distintos tipos de polen.

Las capas principales de la esporodermis se depositan de manera secuencial en la superficie de la microspora. Se inicia con la formación de la primexina o glyocalix, que se sitúa entre la pared de calosa y la membrana plasmática. Es una capa de naturaleza mayoritariamente polisacárida, que se deposita centrípetamente y que actúa como una plantilla, con regiones receptivas y no receptivas, del material precursor de la exina, llamado esporopolenina. Los precursores de este material se sintetizan en las células del tapete y también en la microspora, de tal manera que ambas colaboran en la formación de la pared del polen. La capa más externa de la exina, ectexina, consiste inicialmente en estructuras de esqueleto sobre las que se produce un depósito continuado de esporopolenina que las van transformando en una pared consistente, compleja y resistente. Seguidamente, en la cara interna de la ectexina, se deposita la endexina, que lo hace sobre estructuras tri-lamelares que se colmatan con depósitos de esporopolenina, de manera que, en los granos de polen maduros de las angiospermas, solo son observables en las regiones aperturales. Sin embargo en los granos de polen maduros de las gimnospermas la endexina se caracteriza por tener numerosas lamelas ordenadas.

Finalmente, después de que la capa externa, exina, se haya consolidado y la microspora haya sufrido la mitosis, se deposita la intina. En este momento se considera que la microspora se ha convertido en grano de polen joven. La intina es una capa de naturaleza polisacárida formada por pectinas, celulosa y diversos azúcares, así como proteínas y enzimas características. Tiene un papel fundamental en la protección del citoplasma frente a los intercambios de agua, regulando los cambios de presión osmótica, para preservar intactas las células gaméticas y vegetativa, con el fin de que puedan llevar a cabo con éxito la fecundación.

Durante todo el período ontogénico las células más internas de la pared de la antera, las células del tapete, juegan un papel relevante en el desarrollo de los granos de polen. Se conocen dos tipos fundamentales de tapete: el secretor, también llamado parietal, glandular o celular no sincitial, y el ameboide, sincitial invasivo o periplasmodial. En los tapetes secretores las células se mantienen *in situ* hasta su degradación final, mientras que en los tapetes ameboides, los protoplastos tapetales invaden el lóculo, formando un plasmodio que está en contacto directo con las microsporas en desarrollo. Las células del tapete pasan por diferentes ciclos de actividad secretora y de degradación. Su papel en el desarrollo de

les microsporas incluye la producción y liberación de proteínas, la formación de precursores de la pared (esporopolenina), y el depósito de sustancias lipídicas que al final del desarrollo recubren exteriormente la pared de los granos de polen, como la trifina y el *pollenkitt*.

El *pollenkitt* está formado por ceras, lípidos, pequeñas moléculas aromáticas y proteínas. Se acumula en plastidios que en la madurez se degradan y dejan en libertad masas o gotas de *pollenkitt* que recubren los granos de polen maduros. Es muy denso y abundante en granos de polen entomófilos y menos en los anemófilos. Al *pollenkitt* se le atribuyen diversas funciones:

- Éxito en la dispersión de los granos de polen.

- Modulación del intercambio de agua entre los granos de polen y el ambiente.

- Protección frente a las radiaciones solares y la falta de agua.

- Determinación del color del polen.

- Atracción de polinizadores.

- Mantenimiento de las proteínas esporofíticas en las cavidades de la exina.

En este último caso el *pollenkitt* favorece la dispersión de proteínas esporofíticas de la antera que se transportan situadas en el exterior del polen, por lo que, podrían inducir la respuesta alérgica a proteínas no específicamente gaméticas.

Los tapetes secretores producen además los orbículos tapetales (cuerpos u orbículos de Ubisch) (Fig 1). Son partículas de esporopolenina que se encuentran alineadas en las paredes tangenciales y radiales del tapete. Son resistentes a la acetólisis y reaccionan de forma similar que la exina a diferentes tinciones histoquímicas, evidenciando que su componente mayoritario es esporopolenina. Presentan un corazón o parte interna formado por lípidos, polisacáridos y proteínas. Proteínas que en algunos casos, como por ejemplo Cupressaceae y Poaceae, se ha visto que son proteínas alergénicas. Las funciones de los orbículos o cuerpos de Ubisch están relacionadas con el mecanismo de transporte de la esporopolenina del tapete a las microsporas en desarrollo, así como con el transporte de proteínas esporofíticas, protección de material sensible a los componentes del fluido locular y dispersión de los granos de polen. Son pauci-partículas y su presencia en la

atmósfera libres o unidas a los granos de polen constituyen un elemento más en el transporte y difusión de los alérgenos en la atmósfera.

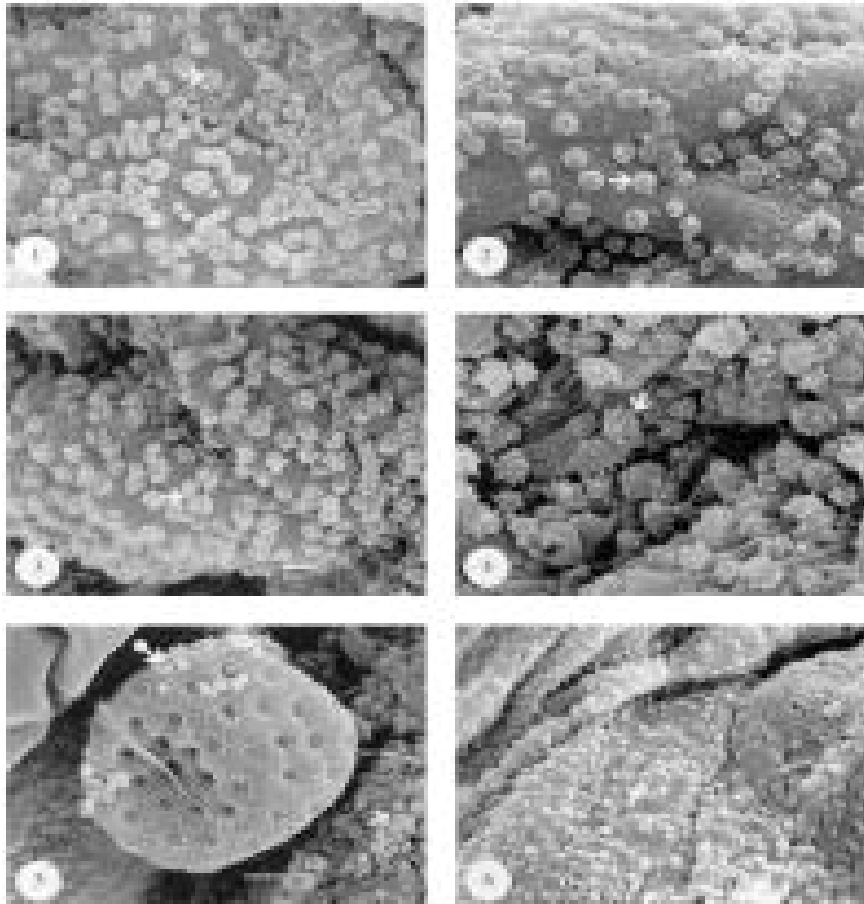


Fig. 1. Cuerpos de Ubisch. Tomado de Vinckier S et al. Allergy 2001; 56:1129-1136

Los granos de polen maduros de las angiospermas están formados por una célula vegetativa de gran tamaño, que contiene abundantes metabolitos, necesarios para el rápido crecimiento del tubo polínico, y una célula generativa pequeña, completamente incluida en la anterior que dará lugar a las dos células espermáticas o gametos. Ambas están rodeadas por la pared que las protege de los daños mecánicos y ambientales.

Durante la dehiscencia de las anteras, los granos de polen sufren una deshidratación rápida que reduce el volumen del polen un 35%. Cuando llegan a un estigma receptor o a un medio húmedo, como puede ser la mucosa de las personas sensibles, experimentan una hidratación considerable. Una vez hidratados los granos de polen transfieren proteínas y enzimas al medio. Estas proteínas del polen serán las que intervengan en el proceso germinativo pero también en la respuesta alérgica de las personas sensibles. Los alérgenos polínicos son rápidamente liberados al ponerse en contacto con las mucosas nasal u ocular y pueden inducir la aparición de polinosis en pacientes sensibilizados. Existe pues una relación directa entre la solubilidad y la alergenidad de los alérgenos polínicos. Con técnicas de inmunocitoquímica y, gracias a la alta resolución del microscopio electrónico, se localizaron en distintos compartimentos celulares comprobándose que, en contacto con un medio húmedo, difunden rápidamente al exterior (8).

Existe pues una relación directa entre la solubilidad y la alergenidad de los alérgenos polínicos. Con técnicas de inmunocitoquímica y, gracias a la alta resolución del microscopio electrónico, se han podido localizar en distintos compartimentos celulares.

El proceso de hidratación del grano de polen, que de manera natural tiene lugar en la superficie del estigma, está especialmente diseñado para alcanzar el éxito en los primeros momentos de la germinación. Para ello la mayor parte de las proteínas que actúan en este proceso tienen actividad enzimática.

Algunos de estos alérgenos polínicos, de gran incidencia en los problemas de polinosis, presentan actividad enzimática relacionada con el inicio del crecimiento del tubo polínico. Entre ellos destacamos la actividad pectato-lyasa y poligalacturonasa, inhibidora de la invertasa y proteínas transportadoras de lípidos.

1.1.8. Polinosis

La rinitis alérgica tiende, en general, a persistir indefinidamente después del primer episodio, aunque la severidad de los síntomas puede variar de año en año dependiendo de la cantidad de polen liberado al ambiente y de la exposición del paciente durante la estación polínica específica (8); no obstante, un pequeño porcentaje (8%) puede presentar remisiones clínicas espontáneas; por el contrario, entre un 7% y 30% de los pacientes puede terminar desarrollando asma bronquial (14).

Aunque la enfermedad puede aparecer a cualquier edad, la edad de comienzo más frecuente es por debajo de los 10 años en los varones y entre los 10-20 años en las mujeres (13). La máxima prevalencia está entre los 14-24 años (13). Los síntomas son estacionales, apareciendo durante la época de polinización de aquellos pólenes a los cuales el paciente está sensibilizado. Para los alérgicos a las Poaceae, los meses más severos corresponden a Mayo y Junio (Europa, EE.UU) (11, 4), aunque pacientes muy sensibilizados pueden presentar ya síntomas los días soleados a partir del mes de Febrero (13). En este período es característico que los pacientes empeoren con las salidas al campo y que mejoren en los días lluviosos, e incluso que lleguen a estar asintomáticos si se desplazan a lugares costeros (donde la incidencia atmosférica de Poaceae es baja) (13). Los sensibilizados a Cupressaceae presentan por el contrario, los síntomas durante los meses de invierno y con frecuencia éstos son confundidos con viriasis (14).

Para comprender mejor la relación de la sintomatología con las condiciones atmosféricas, hay que tener en cuenta que la mayor o menor pluviosidad durante el otoño e invierno condicionan la mayor o menor germinación y crecimiento de las hierbas (Poaceae) y por tanto una mayor o menor carga de pólenes atmosféricos durante la primavera (14). Durante el periodo de polinización, las concentraciones atmosféricas de pólenes aumentan con el incremento de temperatura (días secos y soleados) y disminuyen con la lluvia o frío, y en general, a lo largo del día las mayores concentraciones suelen aparecer por la mañana (emisión de pólenes por las plantas) y al atardecer (pues al enfriarse el aire, los pólenes tienden a bajar desde las capas más altas de la atmósfera hacia el nivel del suelo (14).

1.1.9 Papel de los pólenes en la patogenia de la rinitis y el asma

Según el informe “Alergológica 2005” de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC), el impacto de los aeroalérgenos sobre la salud pública tiende a variar de unas regiones a otras dependiendo de su variabilidad aerobiológica, meteorológica, nivel de exposición a contaminantes atmosféricos locales y susceptibilidad individual (12). Según este estudio, el 34,3% de la población consulta por rinitis alérgica, y el 7,2% por asma y un 20,4% por ambos procesos. Concretamente, la región de Madrid, es la que registra el mayor número de casos de rinoconjuntivitis (75,2%) y asma alérgico (50.7%), siendo los aeroalérgenos (pólenes, ácaros, epitelios de animales y esporas de hongos) la causa principal. Como pólenes más relevantes causales de rinoconjuntivitis destacan las *Poaceae* (61.9%) seguido del polen del *Oleaceae* (45,6%), *Cupressaceae* (34,1%), *Platanaceae* (22,1%) y *Chenopodium-Amaranthaceae* (11,2%). Del total de personas con rinoconjuntivitis, el 40% reaccionan a varios tipos de polen (polisensibilizados), lo que hace que los síntomas alérgicos se alarguen en el tiempo.

Un porcentaje importante de los pacientes que sufren rinoconjuntivitis polínica terminan desarrollando asma bronquial. El porcentaje difiere en función del polen responsable, habiéndose estimado que es del 20% para las *Poaceae*, 30% para el abedul y 60% para la parietaria (8). Sin embargo durante muchos años ha existido una controversia acerca de cómo los granos de polen podrían inducir asma. Reed et al en 1971 (15), realizando en el laboratorio provocaciones bronquiales con granos de *Ambrosia* enteros, en pacientes con asma polínico, fueron incapaces de inducirles broncoespasmo. Por el contrario las provocaciones inhalatorias realizadas con el polen fragmentado, sí eran capaces de producir asma.

1.1.10 Relaciones entre exposición alérgica y síntomas en los pacientes con polinosis

A la hora de establecer cuáles son los umbrales de reactivación clínica, hay diversos aspectos que se deben tener en cuenta (13):

- El rango de gravedad de la polinosis es muy amplio de paciente a paciente.

- Muchos pacientes presentan sensibilizaciones a otros pólenes de plantas que florecen simultáneamente con las Poaceae como por ejemplo los Oleaceae.
- El umbral de respuesta tanto nasal como bronquial va disminuyendo a lo largo de la estación.
- En los síntomas también pueden contribuir alérgenos polínicos que se encuentran en micro partículas fuera de los granos de polen y cuyas concentraciones atmosféricas pueden presentar serias divergencias con los recuentos.
- Muchos factores pueden incrementar la exposición individual a los pólenes (automóvil) o a sus antígenos (cortar el césped).
- Las concentraciones obtenidas varían en función de la localización del colector (altura y entorno).

Intentar reproducir a nivel experimental una exposición natural, es una tarea difícil. En este aspecto, la monitorización de los alérgenos resultaría clave para identificar las posibles relaciones entre la exposición alérgica y la aparición de los síntomas (13).

1.1.11 Identificación de los alérgenos polínicos

Mediante técnicas adecuadas se pueden identificar los componentes del polen que causan alergia, definir su actividad, purificarlos y estandarizarlos con fines diagnósticos y terapéuticos.

Según el grado de respuesta de las personas sensibles al alérgeno estos se clasifican en:

- * Alérgenos principales: aquellos que provocan reacción en la mayoría de los pacientes, mayor del 90% en la prueba de prick Test, o mayor del 50% mediante cuantificación de la Ig E específica.
- * Alérgenos menores: aquellos que, sin embargo tienen un efecto importante sólo en un número pequeño de pacientes (10% o menos) o un efecto bajo en un número grande de pacientes.

La identificación, el aislamiento y la purificación de alérgenos de polen comienzan con la extracción y la solubilización del polen de las flores recolectadas. El extracto acuoso luego experimenta análisis diversos según la meta de la investigación.

Para conocer la composición química, se determinan las proteínas, el contenido total de nitrógeno y el nitrógeno proteico, además del análisis de la estructura de aminoácidos, glúcidos, lípidos, etc.

Por lo que respecta a las propiedades físicas (el peso molecular, la carga eléctrica, y el punto isoelectrico) se aplican métodos como la ultracentrifugación analítica, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), electroforesis en gel del poliacrilamida (SDS-PAGE), electroforesis y enfoque isoelectrico (IEF). Para la caracterización del antígeno se usan técnicas inmunológicas de inmunoprecipitación inmunoelectroforesis e inmunoelectroforesis cruzada.

Recientemente las técnicas immunoquímicas han sido respaldadas por las técnicas de proteómica que identifican las secuencias de los aminoácidos.

1.1.12 Objetivos de la monitorización de aerolárgenos (13)

- Medir los niveles de exposición a alérgenos en una población.
- Identificar factores que influyen en la concentración de aeroalérgenos.
- Valorar métodos de reducción de exposición y la repercusión clínica de su eficacia.
- Determinar la relación entre los alérgenos aerovagantes y sus efectos en los síntomas.
- Determinar si la exposición a alérgenos durante una provocación bronquial corresponde a una exposición natural.

- Comparar los niveles medidos con los valores umbrales de riesgo.
- Contribuir a un mejor entendimiento de la fisiopatología del asma.

Con el fin de alcanzar estas metas, se necesitan más estudios sobre sensibilidad, especificidad y reproductibilidad de los muestreos tanto en salas experimentales como en condiciones reales (13).

Existen diferentes colectores que nos permiten captar los granos de polen que se encuentran en la atmósfera, para poder clasificarlos mediante el estudio microscópico. En un inicio se utilizaron los colectores gravimétricos tipo Durham (16), que empleaban portaobjetos horizontales, cubiertos de vaselina y expuestos durante 24 horas, permitiendo que las partículas aéreas quedaran depositadas por su propio peso (deposición gravimétrica). Estos colectores han quedado obsoletos debido a que nos proporcionaban cálculos planimétricos (granos por cm^2) y no volumétricos, ya que se desconocen los volúmenes de aire a los que ha estado expuesto el colector durante esas 24 horas. Otro de los inconvenientes que presentan es su escasa rentabilidad para captar las partículas menos pesadas, tales como los pólenes inferiores a $20\ \mu$ o las esporas de hongos, que debido a su baja densidad son fácilmente resuspendidas por el viento antes de que puedan quedar atrapadas en el portaobjetos.

Actualmente podemos realizar estudios aerobiológicos mucho más exactos, mediante los colectores volumétricos como por ejemplo el Burkard Spore Trap (16). Con ellos podemos obtener cálculos volumétricos, es decir, concentraciones de esporas o granos de pólenes por metro cúbico de aire. Además, estos colectores tienen la ventaja de ser muy eficientes para captar también las partículas inferiores a $20\ \mu\text{m}$.

Dentro de los colectores volumétricos, el más utilizado en Europa es precisamente el Burkard Spore Trap. Este consta de una cámara de admisión, que aspira un volumen de aire de 10 litros por minuto a través de una pequeña hendidura de 14 mm de largo por 2 mm de ancho y que está permanentemente orientada frente a la dirección del viento, gracias a la

acción de una veleta incorporada en el colector. Las partículas contenidas en el aire succionado son impactadas en una cinta muy próxima a la hendidura. La cinta consiste en una película transparente de plástico, que se monta sobre un tambor y a continuación se recubre con una capa fina y uniforme de vaselina filante. El mecanismo de relojería está incorporado en el propio tambor, permitiendo que este rote a una velocidad de 2 mm/hora y durante un periodo de hasta 7 días. Las medias diarias son como normalmente se expresan los recuentos. Hay que tener presente que, por ejemplo, una media diaria de 20 granos/m³ de aire puede obtenerse en un día donde las concentraciones a lo largo del día hayan oscilado entre 0-90 granos/m³. Es posible con el Burkard hacer también los recuentos por hora (2 mm), pudiéndose obtener así curvas circadianas.

1.1.13 Influencia de las variables meteorológicas sobre la floración, polinización y espectro polínico.

Son numerosos los autores que hacen referencia al efecto de las precipitaciones sobre el espectro polínico, efecto que depende de la época del año y de la densidad polínica del momento en que se producen (8). Mientras que una pluviosidad muy baja o nula puede favorecer el transporte de polen (8) y dar lugar a picos de concentración (8), la aparición de precipitaciones puede provocar un descenso de las concentraciones polínicas atmosféricas (8).

Otro aspecto a considerar es el régimen en que se producen las lluvias, ya que una lluvia ligera y local puede no afectar al espectro, pero continuada durante varios días o intensa y poco duradera, limpia la atmósfera (8). Una duración superior al 20% del tiempo de muestreo en plena floración, puede disminuir a la mitad la cantidad de polen recogido durante el mismo (8). Si se tienen en cuenta los resultados del análisis no paramétrico, la aparición de lluvia (en cantidades superiores a los 10 l/m²) coincide con descensos en el contenido polínico atmosférico en un 70,6 % de los casos. Se estima oportuno establecer como umbral los 10 l/m² porque, de acuerdo con las observaciones de diferentes autores (8), la aparición de lluvias escasas y en solo 1 ó 2 días de la semana de exposición, apenas afecta a la concentración de polen aerovagante. Sin embargo, se ha podido constatar que la aparición de lluvias más o menos intensas, de forma continuada durante varias semanas, y

en época de floración ha dado lugar a un descenso en las cantidades semanales de polen registradas en la práctica totalidad de los tipos.

Otra de las variables meteorológicas que afecta el contenido de pólenes en la atmósfera es la dirección predominante del viento. El captador de pólenes recoge con mayor probabilidad granos de polen pertenecientes a plantas situadas en el trayecto del viento con lo que, cambios en la dirección de éste darán lugar a cambios, sobre todo cualitativos, en las muestras analizadas. Las oscilaciones de concentración en ciertos tipos polínicos parecen estar relacionadas con determinadas direcciones del viento (17). Por ejemplo, En Córdoba, se suele observar una relación positiva entre las concentraciones del Oleaceae y los vientos de dirección EN. En cambio, ésta parece ser negativa con los vientos de dirección SO (18).

Para poder obtener unas conclusiones significativas y estadísticamente fiables de la influencia de estas variables es necesario disponer de datos diarios durante el mayor número de años de muestreo.

1.2 Áreas aerobiológicas en España

España es un país de contrastes, en donde podemos encontrar zonas con una pluviosidad de las mayores de Europa (Santiago de Compostela) y otras que por el contrario presentan una pluviosidad casi ausente (Almería) lo que origina una aerobiología muy desigual en las diferentes áreas del país.

Cuando se examinan los recuentos de pólenes de Poaceae aportados por las diferentes estaciones repartidas a lo largo de la península (8) se comprueba que existen 3 áreas aerobiológicamente diferentes, lo cual parece ser motivado por la presencia de 3 áreas climáticas diferentes: la España verde, la España seca costera y la España seca continental.

1.2.1 La España verde

La España verde está formada principalmente por la Cornisa Cantábrica y Galicia, con una pluviosidad entre 1000 y 1500 l/m². Esta gran pluviosidad obedece principalmente a la situación de estas zonas abiertas a las borrascas procedentes del Atlántico. La pluviosidad alta y sobre todo continua de estas zonas da lugar a la presencia de prados permanentes de Poaceae muchas de ellas forrajeras. En general se trata de Poaceae pratenses. Muchas de ellas son capaces de producir grandes cantidades de pólenes muy aerovagantes y alergénicos, sin embargo cuando se examinaron las concentraciones aportadas por las estaciones de estas áreas climatológicas pudo observarse, que si bien durante los ocasionales días soleados se obtenían altas concentraciones atmosféricas de Poaceae, éstas caían rápidamente por el efecto de las lluvias, que también se mantienen de forma casi continua durante los meses de floración, resultando en general las concentraciones medias semanales de Poaceae poco intensas.

1.2.2 La España seca

La España seca corresponde a las 2/3 partes de la península y viene caracterizada por una pluviosidad discreta (300-500 l/m²). La razón de esta escasa pluviosidad se debe a la presencia de gran cantidad de cadenas montañosas que evitan que puedan penetrar las borrascas procedentes del Atlántico al interior de la península, a la presencia del anticiclón de las Azores a menos de 600 millas marítimas y a la situación tan meridional de España.

Las Poaceae que crecen en esta área geográfica corresponden a aquéllas que han sabido adaptarse a estas condiciones de sequedad, por ejemplo *Trisetum Paniceum*, *Lolium rigidum*, *Bromus spp.* Cuando se examinaron los recuentos aportados por las estaciones situadas en la España seca, un hecho que llamó fuertemente la atención fue el de encontrar dos áreas aerobiológicamente muy distintas que se denominan España seca continental y España seca costera, ya que correspondía a su vez a dos áreas climáticas diferentes dentro de la España seca (zona de clima continental y zona de clima costero mediterráneo).

1.2.2.1 La España seca estrecha costera

La España seca costera estrecha está formada por la estrecha franja de tierra comprendida entre el mar Mediterráneo y las cadenas montañosas que prácticamente amurallan todo el litoral mediterráneo. En esta zona la aerobiología de las Poaceae es muy poco intensa. De hecho las concentraciones de pólenes de Poaceae aportadas por las estaciones de Barcelona, Valencia y Málaga resultan ser con mucho las más bajas encontradas en el país.

Dos factores climatológicos explican esta baja incidencia de Poaceae: la alta humedad relativa del aire que actúa como un gran atemperador del clima, lo que permite la presencia de inviernos suaves con primaveras florales muy prolongadas, ya que se pasa de una forma muy progresiva del frío al calor. Esto a su vez condiciona una floración de las Poaceae muy repartida en el tiempo (de Marzo a Septiembre), lo que da lugar a unas concentraciones atmosféricas bajas. El segundo factor es la presencia dominante de brisas marinas diurnas debido a las corrientes de convección ascendentes que se forman por el más rápido calentamiento de la tierra que el mar.

1.2.2.2 La España seca de clima continental

Resulta ser el área geográfica que presenta las concentraciones más altas de pólenes de Poaceae y ello es debido únicamente a su característico clima continental con inviernos muy fríos y veranos muy calurosos con un paso muy brusco del frío al calor, lo que origina primaveras muy cortas pero muy intensas. En apenas 6 semanas (Mayo-Junio) se produce una simultánea floración de la mayoría de las Poaceae que se encuentran en esta zona.

El clima continental es producido por la baja humedad relativa del aire. La baja humedad a su vez es debida a que la humedad procedente del mar no puede penetrar en el interior de la península debido a que se lo impiden las cadenas montañosas que prácticamente amurallan las costas de la península.

En la España seca de clima continental, es hasta ahora, la zona donde se han podido recoger las concentraciones más altas de Poaceae, siendo los promedios de las máximas

concentraciones semanales significativamente mayores que las encontradas en la España verde (la segunda área climatológica más intensa en cuanto a Poaceae atmosféricas) y que la España seca costera (la que presenta la incidencia atmosférica de Poaceae más baja).

1.3. Aerobiología del Área Geográfica de Madrid

La gran importancia alergológica de los pólenes en Madrid puede obedecer en parte a la combinación de un nivel alto de polución atmosférica junto con amplios espacios verdes, que durante los años húmedos da lugar a concentraciones atmosféricas de pólenes de Poaceae muy altas, equiparables a los encontrados en la Europa húmeda del norte (11).

La ciudad de Madrid se encuentra ubicada en la meseta central de España, a 690 m de altitud, inmersa junto con sus alrededores en un piso bioclimático mesomediterráneo seco (temperatura media anual 12 °-16°, pluviosidad 350-600 l/m²) (14). El clima es de tipo mediterráneo contrastado (continental extremo), caracterizado por veranos calurosos, largos y secos (unos 4 meses), con inviernos fríos y con precipitaciones escasas en el invierno, y en general abundantes en otoño y primavera, aunque con grandes fluctuaciones interanuales, que condicionan a su vez importantes variaciones en las concentraciones anuales de pólenes (14). Su climatología permite la presencia de pólenes alergénicos en la atmósfera de la ciudad prácticamente durante todo el año, aunque el 80 % de los pólenes totales anuales se captan en tan sólo 4 meses (Marzo-Junio) (14).

Los pólenes de origen arbóreo que se encuentran en la atmósfera de la ciudad proceden principalmente de las encinas (NO de la ciudad), plátanos de sombra, cipreses, arizónicas (dispersos como árboles ornamentales en el medio urbano), pinos y Oleaceae (22.400 hectáreas de olivar de la zona sur de la provincia). Más modestamente, de los alisos, fresnos, olmos, chopos, moreras y castaños, la mayoría presentes también en el medio urbano como árboles ornamentales (14).

Entre las fuentes de polen herbáceo se destacan las Poaceae, incluyendo más de 180 especies, aunque de ellas sólo un reducido grupo son capaces de producir polen abundante y aerovagante (<45 µ). Si bien en los recuentos no es posible diferenciar las especies de

Poaceae, es probable que entre las más importantes contribuidoras se encuentren: *Dactylis glomerata*, *Trisetum paniceum*, *Lolium rigidum* y *Poa annua*. Otras fuentes de polen herbáceo menos importantes son: *Plántagos* spp, *Rumex* spp, Urtiáceas, *Carex* spp, Quenopodiáceas y Amarentáceas (14).

Desde un punto de vista clínico, el problema que se plantea con los pacientes con polinosis en Madrid es que la presencia de reactividad cruzada y/o presencia de sensibilizaciones clínicas y subclínicas simultáneas en pacientes polisensibilizados (la mayoría en Madrid), dificultan con frecuencia el saber cuáles son los pólenes que principalmente contribuyen en sus síntomas, hecho de crucial importancia para poder realizar una inmunoterapia eficaz (14).

Atendiendo a los taxones de mayor relevancia clínica en el área geográfica de Madrid, para facilitar su comprensión se ha dividido el año en 4 periodos:

Noviembre-Marzo

En invierno, se detectan en la atmósfera de Madrid 2 pólenes clínicamente importantes, las Cupressaceae y las Poaceae. Las Cupressaceae tienen una polinización de 5 meses que alcanza su periodo más álgido en Febrero con media diaria (MMDD) de 80 granos m³ de aire. Es probable que la mayoría de este polen proceda de los *Cupressus arizonica* y *Cupressus sempervirens* (ciprés) cada vez más utilizados como árboles ornamentales; de hecho, una tendencia ascendente en su presencia atmosférica se ha podido detectar durante un periodo de 18 años de monitorización aerobiológica. Igualmente su alergenicidad cada día cobra más importancia en la población madrileña con una prevalencia de prueba cutánea positiva (PCP) frente a un extracto de *Cupressus arizonica* y/o *Cupressus sempervirens* del 23% (14).

Las Poaceae, mucho más alergénicas (94% PCP) también aparecen en la atmósfera durante el invierno aunque de una forma mucho menos intensa (MMDD de 6 granos/m³) y constante que las Cupressaceae. Estas aparecen principalmente durante los días soleados de Febrero y Marzo y en estudios previos se ha comprobado que con frecuencia también

reactivan a los pacientes especialmente durante esos días anticiclónicos (14) aunque globalmente (suma de Enero-Marzo) no representan más del 8% de las Poaceae totales anuales impactadas en el colector.

Abril

En el mes de abril encontramos en la atmósfera de Madrid, también dos pólenes clínicamente importantes, las Poaceae en concentraciones escasas (MMDD de 4 granos/m³), con un comportamiento aerobiológico similar al de Febrero y Marzo y el plátano de sombra (14) que por el contrario aparece en altísimas concentraciones de mediados de Marzo a mediados de Abril, con MMDD de 200 granos/m³ de aire. La tendencia en su presencia atmosférica ha sido sorprendentemente ascendente, pasando su contribución en los pólenes totales anuales del 15 % (1980-83) al 27 % (1992-95). Este hecho, se ha acompañado además de un dramático incremento porcentual de PCP frente a este polen en los últimos años entre los pacientes con polinosis en Madrid, que ha pasado de un 2% en 1984 a un 52 % en la actualidad. Además en un estudio realizado en Madrid (19), se ha podido comprobar que al menos el 28 % de los pacientes con polinosis en Madrid, presenta síntomas de rinoconjuntivitis que claramente se correlacionan con la exposición natural a este polen.

Mayo y Junio

En este periodo encontramos en la atmósfera de Madrid 2 pólenes importantes en cuanto a la prevalencia de PCP: las Poaceae (94%) y los Oleaceae (61%). De éstos, el más abundante en la atmósfera corresponde al de las Poaceae (77% de las Poaceae totales anuales, MMDD de 86 granos/m³) seguido del Oleaceae (MMDD de 68 granos/m³). Es difícil saber hasta qué punto los Oleaceae contribuyen en los síntomas de polinosis, ya que polinizan simultáneamente con las Poaceae y los pacientes sensibilizados a ellos casi constantemente lo están también a las Poaceae. Sin embargo, hay varios datos que apuntan a las Poaceae como el tipo de polen clínicamente más relevante en el medio urbano de Madrid (14)

- Es el polen alergénico más abundante en la atmósfera durante Mayo-Junio.
- Es el que da lugar a más pruebas cutáneas positivas entre los pacientes con polinosis.
- La curva de síntomas de los pacientes sigue significativamente la curva de pólenes de Poaceae.

Julio-Octubre:

Si bien en Julio todavía hay concentraciones apreciables de Poaceae (MMDD de 27 granos/m³) éstas caen bruscamente en Agosto (MMDD 2 granos/m³), siendo casi imperceptibles en Septiembre (MMDD 1 grano/m³). Por el contrario es en este periodo ascienden las quenopodeáceas-amarantáceas que se hacen máximas en Septiembre, aunque con unas MMDD de tan sólo 5 granos/m³, representando apenas el 1,6 % de los pólenes totales anuales. Sin embargo esta escasa presencia atmosférica contrasta con su alta capacidad de sensibilización, ya que el *Chenopodium album* da lugar a una prevalencia de pruebas cutáneas positivas del 52 % (14).

1.4. Relevancia aerobiológica y clínica de las Poaceae en el área geográfica de Madrid

Las Poaceae parecen ser con mucho la principal causa de rinoconjuntivitis estacional en el entorno urbano de Madrid, especialmente durante los meses de Mayo y Junio. Otros pólenes clínicamente importantes que pueden globalmente contribuir a los síntomas de una forma más modesta que las Poaceae son las Cupressaceae, el plátano de sombra y el Oleaceae (14).

1.5. Origen y significado de partículas micrónicas dependientes de plantas

La mayor parte de los alergen transportados en el aire parecen ser proteínas y se asocian a partículas biogénicas que miden de 2 a 60 μm . Tanto las formulaciones teóricas como los resultados obtenidos de las pruebas directas realizadas con granos de polen marcados isotópicamente, han confirmado la ausencia de partículas en el rango de 18 a 20 μm de las vías aéreas por debajo de la carina (3). Sin embargo, los aerosoles de 5 μm y también los menores, pasan habitualmente y quedan retenidos más allá de los bronquiolos terminales.

Se ha descrito de un modo convincente la reactividad bronquial IgE mediada frente a productos químicos simples tales como el anhídrido tálico, la fenilglicina y los cloropatinatos (21).

Puesto que la mayoría de las partículas del tamaño de un polen no penetran en los bronquiolos terminales, que son la principal localización donde se producen los cambios obstructivos, deben considerarse mecanismos alternativos de respuesta de las vías aéreas; entre estos mecanismos cabe citar los reflejos desencadenados por receptores nasofaríngeos o el transporte por vía hematógena de alergen desde las superficies de las mucosas. Además, se ha confirmado la asociación de determinados alergen de polen a partículas transportadas por el aire más pequeñas que los granos intactos. Este material activo puede ser transportado por fragmentos vegetativos y humus de plantas o eluido a partir del polen depositado y resuspendido por acción de la lluvia en colecciones de líquidos estables. Sin embargo, todavía no se ha comprobado la contribución relativa de los granos intactos y de los microaerosoles relacionados como vectores de la exposición alérgica.

1.5.1 Alergenos de pólenes en partículas micrónicas

El significado clínico de las pequeñas partículas portadoras de alergen de plantas ha generado un debate importante en los últimos años. La existencia de estas partículas alérgicas ha sido demostrada claramente en las dos últimas décadas para diversos grupos de plantas incluyendo la ambrosía (22), el roble (17), *Poaceae* (23) y las betuláceas (24). Estas pueden ser detectadas antes de la estación de pólenes y puede persistir después de la

polinización, contribuyendo de manera importante a la carga total de alergenitos dependientes de plantas en el aire durante la estación. Por ejemplo, ha sido demostrado que durante el pico de ambrosía casi el 50 % del total de alergenitos puede estar asociado con partículas más pequeñas que los granos de polen (23). Estas se encuentran dentro de las dimensiones respirables de tal manera que pueden penetrar muy profundo en la vía aérea y pueden provocar crisis de asma. Los alergenitos en estas partículas son también importantes como agentes inductores de polinosis (25, 26, 27). Sin embargo poco se sabe sobre la prevalencia de estas partículas en la atmósfera, su variación geográfica y temporal y su composición química detallada. De forma similar su origen exacto es desconocido pero se han propuesto varios mecanismos que lo expliquen, interviniendo como variables la climatología, el hábitat y la contaminación.

1.5.2 Posibles fuentes:

- Material procedente de las plantas diferente a los granos de polen como por ejemplo, hojas, tallos, anteras, etc. (17).
- Orbículos o cuerpos de Übisch (partículas esféricas de 0,02-0,4 μm de diámetro), del revestimiento de las anteras de algunas plantas que pueden ser aerovagantes. Estos cuerpos consisten en esporopolenina, el mismo biopolímero que constituye al polen (28).
- Algunas investigaciones sugieren que algunos alergenitos se hacen aerovagantes como aerosoles de la savia, como por ejemplo, cuando los tallos se cortan (29).
- Se ha sugerido (30) que una posible fuente son los fragmentos formados por la degradación del polen en el ambiente, aunque no parecer ser esta la contribución más importante porque los granos de polen son generalmente muy resistentes a la abrasión en el aire seco. El tiempo que tarda un grano de polen para ser fragmentado de esta forma depende de la humidificación de su pared.
- Las proteínas de superficie pueden ser transferidas a pequeñas partículas de la contaminación (30). Claramente hay un potencial para la interacción con contaminantes aéreos como por ejemplo las partículas dependientes de diesel. Esto puede incrementar la potencia de los alergenitos para sensibilizar a los pacientes.

- Los granos de polen maduro de algunas especies se pueden romper a través de un choque osmótico si son humedecidos en estadio fresco (31). A medida que se humedecen los gránulos de almidón (leucoplastos) que se encuentran en su interior son liberados al aire. Es interesante tener en cuenta que este fenómeno fue observado inicialmente por Blackley, pero su significado no se ha reconocido hasta el momento actual en el contexto de los episodios de asma asociados con las tormentas (32, 33) (Fig 2.).

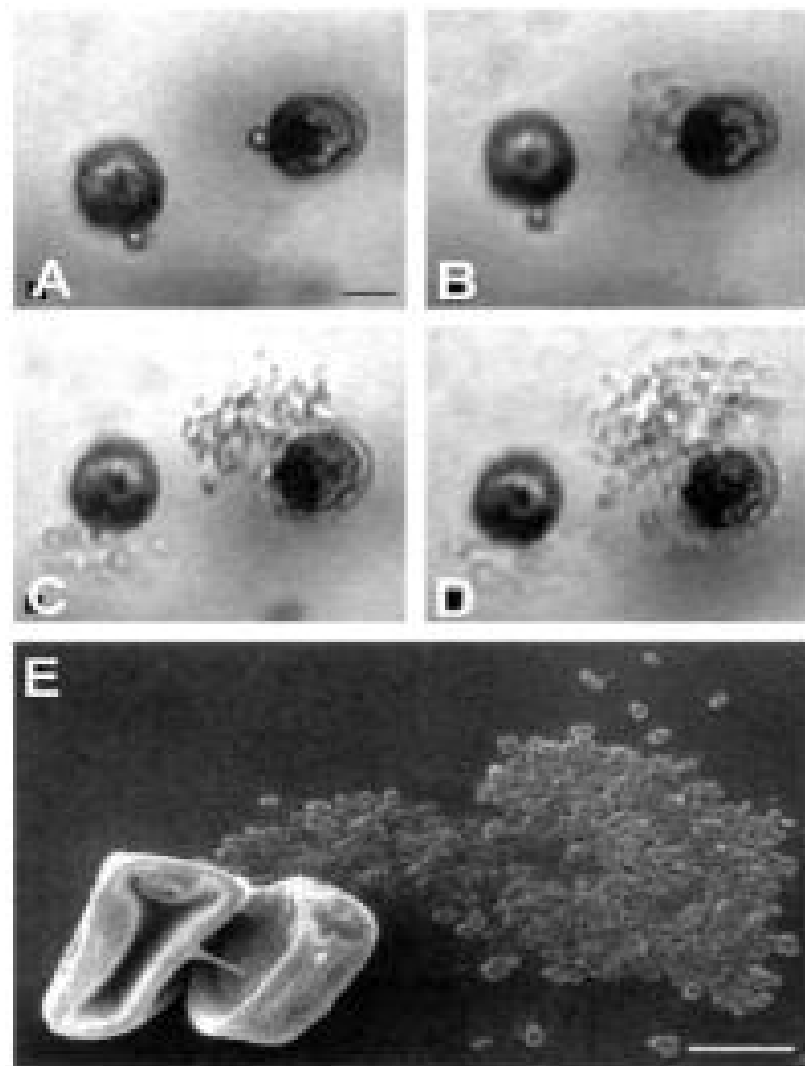


Fig. 2. Gránulos de almidón. Tomado de Taylor PE. J Allergy Clin Immunol. 2002 Jan; 109 (1):51-6.

Varias epidemias de asma han ocurrido después de tormentas en Melbourne (34) y Londres (35). En el primer caso, cada hallazgo epidémico durante el mes de Noviembre sugería que la estación era el factor responsable. La contaminación ambiental no se implicó en estos episodios ya que las concentraciones de ozono, dióxido de nitrógeno y dióxido de azufre no fueron lo suficientemente altas en comparación con los días no epidémicos. Los pacientes asmáticos que sufrieron crisis durante esas tormentas tenían pruebas cutáneas positivas de gran diámetro frente a *Lolium perenne* en comparación con pacientes asmáticos que no fueron afectados en esas ocasiones. Estos autores australianos demostraron que estos gránulos de almidón del polen del *Lolium perenne* contienen el alergeno Lol p 5, siendo capaces de producir pruebas cutáneas y provocaciones bronquiales positivas en pacientes con asma polínico (34). Estos gránulos de almidón pueden explicar los días epidémicos de asma ocurridos en Melbourne en 1.987 (incremento en cinco veces del número de asistencias hospitalarias por asma) y en 1.989 y en Londres durante 1.994. El denominador común de esas tres epidemias fue la presencia de una tormenta durante la polinización de las Poaceae. Las concentraciones de Poaceae atmosféricas eran altas antes de la tormenta y aunque estas descendieron por el efecto de la lluvia, por el contrario las pequeñas partículas ($< 5 \mu\text{m}$) se mantuvieron (Londres), o se incrementaron (Melbourne) durante algún tiempo después de que la tormenta se hubiera iniciado.

Un grano maduro de *Lolium perenne* contiene cerca de 700 gránulos de almidón en un rango de tamaño de 0,6-2,5 μm y se sugiere que estas epidemias de asma fueron probablemente causadas por reacciones alérgicas a las partículas micrónicas liberadas por los granos de polen al poder penetrar fácilmente en las vías respiratorias distales y si bien su concentración atmosférica es apreciable durante toda la estación, esta se incrementa unas 50 veces durante las precipitaciones.

- Se ha demostrado que el alergeno del *Lolium perenne-1* (Lol p1) se une a las partículas de escape diesel y estas partículas alérgicas podrían ser inhaladas hacia la vía aérea inferior (36). Hasta la fecha se han realizado estudios sobre las partículas de escape diesel (PED).
- Ingenieros ambientales han estudiado la composición química de aerosoles ambientales. Las mayores contribuciones a la mezcla de partículas aerotransportadas la constituyen las partículas procedentes de los motores de escape

diesel, el polvo de las carreteras, el humo de las maderas, entre otros. Concentraciones menores de partículas se derivan de restos de neumáticos, humo de cigarrillos, restos vegetales (incluyendo al polen) y vapores de la combustión del gas natural. Los efectos alérgicos relativos de cada uno de los componentes de esta mezcla de partículas, deben ser evaluados.

1.5.3 Partículas alérgicas y recuentos de pólenes. Algunas relaciones básicas

Algunas relaciones básicas entre las concentraciones de polen y alérgenos en otras partículas han sido determinadas, pero muchos aspectos permanecen en espera de ser investigados en detalle. Pocos proyectos han verificado sus variaciones a lo largo del año. En 1995, Takahashi Y et al. (30), encontraron actividad alérgica en todos los tamaños de rango de partícula estratificados de *C. japonica* ($>7,2$; $2,4 - 7,2$ y $<2,4 \mu\text{m}$) y no encontraron correlación de estos estratos con el recuento de pólenes. Este grupo valoró la influencia de factores climatológicos sobre la presencia y antigenicidad de las partículas. Sobre los granos de polen objetivaron que durante los días pico, los factores determinantes son la temperatura y la humedad relativa. Antes del periodo de polinización, encontraron actividad alérgica importante en el estrato más pequeño de partícula, mientras que en las de tamaño medio no se registró actividad. Los factores meteorológicos, no afectaron la presencia de las partículas más pequeñas. La lluvia barrió a las partículas grandes, mientras que las más pequeñas se mantuvieron aerovagantes. Encontraron que el 52% del total de la actividad alérgica correspondía al rango de partícula $<2,4 \mu\text{m}$ y su aparición era posterior al pico de granos de polen. El 30% de la actividad alérgica total correspondió al rango de partículas de $>7,2 \mu\text{m}$, y en las de tamaño medio no encontraron ninguna actividad.

Respecto a las partículas $<1 \mu\text{m}$, estas se vieron afectadas por la temperatura antes del periodo de polinización, lo que hace pensar que el calentamiento de la planta propicia la liberación de material antigénico antes de este periodo. Respecto a la presencia de lluvias, encontraron una correlación positiva con estas partículas, dando soporte a la teoría del transporte por microgotas de agua.

Resaltan además que aún cuando las propiedades antigénicas de los componentes de un extracto se conocen, las funciones naturales de estas moléculas se desconocen, y que de año en año el comportamiento antigénico de los pólenes en la misma especie varía dado el contenido proteico diferente de los granos de polen en años sucesivos.

Los recuentos de polen aportan una información de gran valor pero no siempre dan una indicación de la carga total de alergen en la atmósfera. Por ello, los alergen en partículas amorfas, aerosoles o gotas de agua deben tomarse en consideración.

2. ALERGIA Y CONTAMINACIÓN

En los últimos años se ha observado un incremento en la prevalencia de las enfermedades alérgicas, representando una de las mayores fuentes de incapacidad en los países desarrollados (37). Aunque este aumento de prevalencia podría deberse al mejor diagnóstico y a que los pacientes han aprendido a informar sobre sus síntomas, existe evidencia sobre la existencia de diferentes fenotipos del asma bronquial (37). Además, el número de niños diagnosticados de dermatitis atópica se ha duplicado en los últimos 20 años y la fiebre del heno ha presentado un incremento similar (38-41).

La percepción del papel de la contaminación en el asma bronquial cambió con el trabajo de von Mutius y colaboradores, quienes compararon la prevalencia de asma en niños escolares de las ciudades de Munich y Leipzig (42). El nivel de contaminación era mucho mayor en Leipzig, y los investigadores esperaban encontrar un incremento concomitante de la frecuencia del asma bronquial. Sorprendentemente, objetivaron menos enfermedades alérgicas en Leipzig. Estos investigadores, posteriormente encontraron que la atopia, era menos común en Alemania Oriental que en la Occidental (41). A continuación, encontraron que la prevalencia de la atopia se había incrementado en Alemania Oriental, en la medida en que se ha occidentalizado (41), aun cuando no se ha verificado un incremento en la prevalencia del asma. Estos resultados sugieren que el incremento de las enfermedades alérgicas se debe a factores asociados con el estilo de vida occidental.

De diferentes estudios epidemiológicos en niños (estudio ISAAC 1998) (43) y adultos (estudio ECRHS 1996) (44), se han podido identificar algunos factores predisponentes:

- Hay diferencias regionales hasta de 10 veces en la prevalencia del asma y de otras enfermedades atópicas.
- Las enfermedades alérgicas son más comunes en los ambientes occidentalizados limpios.
- El asma y la atopia son menos comunes en los niños de granjeros.
- El asma y la atopia son menos comunes en los hermanos más jóvenes.
- El asma y la atopia son menos comunes en hogares con perros y mascotas.

Estas enfermedades son además el resultado de complejas interacciones entre mecanismos aún desconocidos de origen genético y ambiental. Muchos factores ambientales han sido implicados en la etiología del asma, entre los que se destacan: el tabaquismo, infecciones virales en la infancia, algunos componentes de la dieta, etc. (45). La identificación de los factores ambientales podría ofrecer una posibilidad real de prevención de este tipo de enfermedades y el conocimiento de los factores genéticos ayudará a la identificación de individuos susceptibles, sobre los que se podría intervenir a temprana edad.

Los conceptos actuales sobre la patogénesis del asma, postulan que el inicio de la enfermedad y su curso clínico, está determinado por las interacciones genéticas y ambientales (45). Esto quiere decir, que las personas que desarrollan asma, presentan susceptibilidad genética y reciben un estímulo ambiental apropiado. En función del espectro de severidad de la enfermedad, parece ser, que la influencia de los factores genéticos y ambientales es diferente. Es decir, genotipos de enfermedad diferentes, responderán a los distintos estímulos ambientales en una mayor o menor cuantía.

En cuanto al papel de los alérgenos, todos son proteínas, muchas con una actividad enzimática en su estado natural. Sólo un rango limitado de partículas es de tamaño respirable para penetrar en la vía aérea inferior y aún no está claro si los factores físicos de la ubicuidad de los alérgenos, su respirabilidad y solubilidad, son suficientes para explicar el por qué inducen este tipo de enfermedades (46). En la actualidad existen herramientas para la descripción de su estructura y de los eventos que controlan la interacción del alérgeno con el sistema inmunológico, por lo que mejorará su conocimiento.

De forma particular, algunos alergenicos se asocian con diferentes enfermedades. Por ejemplo, los alergenicos dependientes de pólenes causan de forma predominante rinoconjuntivitis polínica y los derivados de ácaros, gatos y cucarachas, causan asma (46). Las diferencias se deben probablemente a las dimensiones físicas de las partículas. Los niños con eccema atópico no presentan un patrón consistente de sensibilización alérgica, pero reaccionan frente a la mayoría de alergenicos, incluidos los alimentarios. También se observan en menor grado, respuestas IgE transitorias frente a alimentos en la mayoría de los niños, lo que hace pensar que la sensibilización frente a alimentos pueda ser un marcador inespecífico de una predisposición alérgica incrementada.

2.1 Efectos de la contaminación sobre los alergenicos

Los aeroalergenicos de exterior incluyen a los pólenes y esporas, sus derivados, y material procedente de otras fuentes como la savia, el recubrimiento de las anteras y las hojas. La contaminación ambiental puede influir en la cantidad y la naturaleza química de los aeroalergenicos de forma indirecta mediante la disminución de la productividad de la planta y de forma directa alterando a las proteínas alérgicas. La primera influencia se traduce en una reducción de la carga de alergenicos, mientras que la segunda parece potenciarlos (47). Existe un desconocimiento casi total sobre la relevancia de los procesos que operan en estas interacciones.

Influencias sobre el tamaño del polen y su cantidad:

Los contaminantes ambientales inducen estrés sobre un rango muy amplio de tipos de plantas a través de diversos mecanismos como por ejemplo, interferencia de la fotosíntesis y daño de la raíz, ocasionando cambios en su tamaño y en la cantidad de polen que se produce (48,49).

Viabilidad del polen

Se ha informado sobre la reducción de la viabilidad de los granos de polen por contaminantes ambientales (50). La mayoría de estos estudios no han analizado los cambios químicos que los anteriores producen sobre las proteínas de la pared, pero han

documentado manifestaciones físicas como la falta de germinación del grano o el retraso en la formación del tubo polínico.

Algunos contaminantes como: SO_2 , NO_2 y O_3 pueden alterar las proteínas alergénicas del polen mediante el incremento de la cantidad de aminoácidos libres (50).

La relevancia de estos estudios en la alergología reside, en el hecho de que, las proteínas de la pared del polen juegan un papel importante en el reconocimiento químico intraespecífico de la polinización y en las reacciones alérgicas. Existe evidencia científica que valida la hipótesis sobre la alteración de la estructura química de los alergenos de la pared del polen inducida por la contaminación, lo que afectaría la viabilidad (50).

Respecto a los efectos de la contaminación sobre los alergenos, se han analizado áreas con diferentes niveles de polución (51). En las ciudades con mayor índice de contaminación, se objetivó la interacción de estas partículas con la superficie de los pólenes, no ocurriendo así en la ciudad donde existía menor contaminación lo que indica que la probabilidad de fragmentación del polen y la liberación de alergenos por esta interacción, es menor en áreas con escasa contaminación ambiental.

Respecto a contaminantes fotoquímicos o al efecto sinérgico de la radiación ultravioleta sobre los contaminantes, también se han realizado estudios como el de Feder et al. (52) que valoró los efectos de los rayos UV-B y el ozono (O_3), encontrando que el tubo polínico se reducía considerablemente, más que por el mismo estrés.

El polen de las angiospermas es más susceptible a los efectos de la contaminación que los pólenes de las gimnospermas y dentro de las primeras, el procedente de las anemófilas resulta ser más vulnerable que las entomófilas (53).

En condiciones de alta humedad relativa, el estigma puede absorber contaminantes gaseosos (SO_2 , NO_2), convirtiéndolos en ácido sobre los tejidos, lo que produce un cambio en el pH que retrasa el crecimiento del tubo polínico (50).

Faltan más estudios para establecer estos efectos, pero los datos existentes parecen indicar que las proteínas de la pared de los pólenes aerovagantes parecen modificarse por los efectos de la contaminación, incrementando su potencial para inducir enfermedades alérgicas.

Respecto a los estudios llevados a cabo en relación con los efectos de la contaminación ambiental sobre los ingresos por asma, Anderson HR et al. (54), durante un periodo de observación de 5 años (1987-1992), encontró que los contaminantes ambientales pueden tener un efecto sobre los ingresos por asma bronquial.

2.2 Papel del diesel en la polinosis

Partiendo de la base que la mayoría de las fuentes de pólenes alergénicos siempre han estado ahí, no ha sido hasta los últimos 150 años que esta enfermedad ha pasado de ser prácticamente desconocida, a representar en la actualidad el trastorno inmunológico que con más frecuencia afecta al ser humano. Efectivamente la prevalencia de asma y rinitis alérgica se ha ido incrementando dramáticamente en los últimos 80 años en Norteamérica, Japón y Europa.

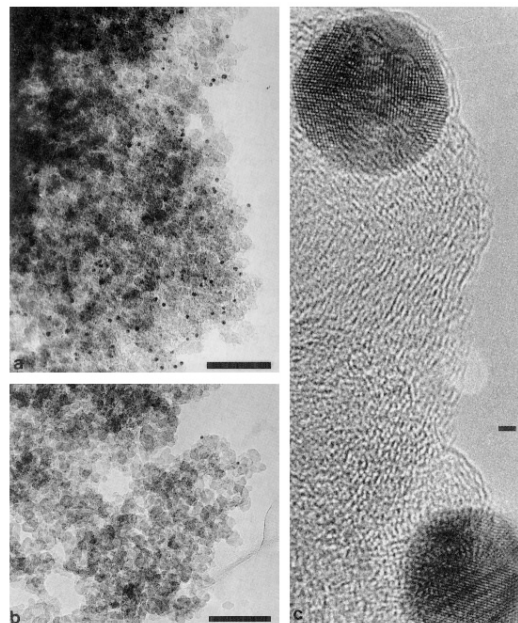


Fig. 3 Partículas de diesels absorbidas por lol p 1. Tomado de Knox RB, Clin Exp Allergy. 1997 Mar; 27(3):246-51.

Además junto con este incremento en la prevalencia, se ha ido observando un incremento en la tendencia de polisensibilizaciones entre los pacientes con rinitis y asma alérgico. En los últimos 20 años en Inglaterra la prevalencia de rinitis alérgica se ha incrementado en un 300-400%, afectando en la actualidad a un 30% de los niños entre los 12-13 años de edad. Precisamente en este mismo país, a raíz de la década de los 50 se realizó un gran esfuerzo por sustituir el carbón por gasoil como fuente de energía. Eso condujo a una importante disminución del "smog", pero también a un cambio cualitativo importante en la composición de las partículas de polución, ya que en la actualidad el 70% de todas ellas y el 90 % de las de $<5\ \mu\text{m}$ (partículas respirables) son precisamente procedentes de la combustión del diesel (Fig 3). La masa de esas partículas es pequeña, pero el área de su superficie es alta y adsorbidos en ellas se encuentran hidrocarburos poliaromáticos importantes, particularmente los fenantrenos, flurotrenos y pirenos que tienen efectos biológicos muy importantes, incluyendo carcinogénesis e incremento de la respuesta tipo Th-2 frente a alergen.

3. METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN INMUNOQUÍMICA DE AEROALERGENOS.

Los alergen consisten en proteínas o glicoproteínas con tamaños moleculares en un rango entre 5-70 kd y con unos puntos isoeléctricos ácidos. Un extracto alérgico contiene muchas proteínas alérgicas, pero sólo unas cuantas son consideradas como alergen "mayores" o "menores" de acuerdo a su capacidad para reaccionar con los individuos alérgicos. Se habla de determinante mayor cuando un 50 % o más de la población es capaz de reaccionar y de determinante menor cuando menos de este porcentaje es capaz de hacerlo (46).

Ahora bien, aunque la mayoría de los alergen son proteínas o glicoproteínas, se ha dado también el caso de moléculas no protéicas con capacidad para actuar como alergen. De igual forma, determinados compuestos de bajo peso molecular pueden interaccionar con proteínas del huésped y actuar como haptenos, estimulando la síntesis de anticuerpos IgE específicos (55).

Para la cuantificación de actividad alergénica aerovagante se utilizan colectores, con un flujo de aire constante y pueden estar equipados con un impactador en cascada capaz de seleccionar partículas en diferentes niveles de acuerdo a su diámetro aerodinámico (16). Los impactadores utilizan una superficie colectora de partícula sólida como los filtros. Otros utilizan un buffer líquido que permite obtener el material captado en forma de eluido desde un principio. Tras el periodo de captación, los eluidos extraídos de estos medios son estudiados mediante métodos inmunoquímicos para la cuantificación de alérgenos (16).

Los principios para la cuantificación de la cantidad de alérgenos en el aire son los mismos que se aplican para la medición de una sustancia química. Sólo el método de ensayo difiere. Para casi todas las aplicaciones, deben captarse grandes cantidades de aire porque la sensibilidad de los inmunoensayos para alérgenos no es tan extraordinaria como la cromatografía, la espectrometría de masa y otros ensayos para sustancias de bajo peso molecular (16). El mínimo volumen de aire requerido depende tanto de la concentración del material en el aire y de la sensibilidad del ensayo. Cuando la concentración total de proteína es alta, en el rango de 100 ng/m³ o mayor, volúmenes de m³ o menores, podrían ser suficientes (16).

Mediante el ensayo de ELISA-Inhibición, se produce una competencia entre alérgeno soluble y alérgeno de la fase sólida por la fijación de la IgE específica del suero humano. La actividad del extracto problema se determina por comparación de los valores de inhibición a diferentes concentraciones de proteína total respecto a los valores de inhibición obtenidos con el extracto de referencia (56).

Gracias a la purificación de los alérgenos mayores ha sido posible desarrollar ensayos inmunométricos de dos fases, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra los alérgenos mayores. Los resultados se expresan en µg o ng de proteína, estandarizados según los extractos de referencia de la FDA y de la WHO (OMS). Esto permite la comparación de resultados de diferentes laboratorios (57).

La mayoría de los estudios publicados en la literatura se relacionan con la cuantificación de alérgenos domésticos: ácaros, gato, cucaracha, roedores (58,59), así como ocupacionales (látex) (60) y pólenes (61, 62).

De los alérgenos de exterior, Solomon WR et al. (26), informaron acerca de la presencia de actividad alérgica aerovagante en partículas más pequeñas que los granos de polen de ambrosía.

3.1 Técnicas utilizadas para verificar la presencia de aeroalérgenos procedentes de pólenes en partículas micrónicas

3.1.1 Captación de partículas micrónicas. Ciclón Burkard.

Ciclón es un nombre genérico dado a varios instrumentos diferentes que tienen en común la propiedad de utilizar la fuerza centrífuga para separar partículas de una corriente líquida o gaseosa. Representa la opción más eficaz y económica en la elección de separadores inerciales. Son los instrumentos más utilizados en la separación de material particulado en la industria.

Los ciclones tienen una simplicidad inherente a su diseño y normalmente carecen de partes móviles, con capacidad de recolección de partículas pequeñas. Los diseños actuales de ciclones pueden separar partículas de tan sólo 2 micras con una eficacia del 90%. La fuerza centrífuga aplicada a las partículas en un ciclón es mucho mayor que la de la gravedad o la inercial aplicada en un separador por gravedad o inercial respectivamente. La fuerza centrífuga aplicada es normalmente del orden de varios cientos de veces la aceleración gravitacional. De este modo, los ciclones representan uno de los más eficaces métodos para la separación de partículas con diámetros de más de 2 micras.

En todos los ciclones las partículas son separadas de la corriente gaseosa por la fuerza centrífuga. Las partículas son dirigidas hacia el exterior de una columna de gas que circula en hélice, mientras que el gas, relativamente libre de partículas, sale del centro del vórtex.

Los dos factores principales que influyen en el funcionamiento del ciclón son:

1. Velocidad a la cual una partícula dada se mueve por la pared del ciclón y

2. Tiempo que la partícula permanece en movimiento allí en donde será recogida antes de que el gas abandone el aparato.

La eficacia total de recolección del ciclón puede ser calculada y elegida teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- Velocidad de entrada
- Diámetro del cuerpo del ciclón
- Viscosidad del gas
- Densidad de las partículas
- Geometría del ciclón
- Razón Longitud/Diámetro del ciclón
- Diámetro del orificio de salida
- Longitud del conducto de salida
- Diseño de la entrada del gas
- Forma del conducto de salida
- Cono del ciclón

En el Burkard ciclón, que es un colector de bajo volumen (16), el aire, cargado de partículas, penetra en la cámara de muestreo de modo tangencial a la misma. De esta forma, las partículas de determinado tamaño abandonan el flujo del aire, impactando en las paredes, quedando, finalmente, depositadas en el fondo del tubo.

El mecanismo de captación se basa en una corriente ciclónica continua de aire generada por un flujo de 16,5 L/min a través del canal de salida del vortex en la parte superior de la cámara de captación. La corriente ciclónica conduce el aire en espiral hacia la parte inferior, en donde se encuentra el tubo Eppendorf. Las partículas, en función de su diámetro aerodinámico equivalente, tendrán mayor o menor dificultad para adaptarse a los cambios de dirección del flujo del aire, por lo que las partículas dentro de los rangos de eficacia del equipo, abandonarán el flujo del aire, quedando depositadas en el tubo Eppendorf.

Las características más destacables de este tipo de ciclones son:

- Bajo volumen de flujo de aire (16,5 L/min)
- Las muestras se recogen en un eppendorf o similar
- Eficacia similar a la del muestreador tipo Hirst
- No ofrece separación por tamaños de diámetro de partícula
- Bajo tiempo de tratamiento de la muestra
- Evita el problema de sobrecarga de los filtros
- Deposición del material
- Eficacia de:
 - 100% de partículas entre 3-10,6 micras
 - 98,63% para 1,06-0,87 micras
 - 93,81% para 0,87-0,75 micras.

El captador ciclónico Burkard tiene una relación fuertemente positiva con el captador volumétrico Burkard 7 días y para los índices de polen en el aire. Su eficiencia ha sido evaluada para otras partículas como esporas fúngicas.

El captador ciclónico Burkard ha sido evaluado por Burkard Manufacturing con partículas de polen, de carbón, y partículas radiactivas en condiciones de funcionamiento de suministro de energía constante (la corriente eléctrica alternante regulada). Si el captador ciclónico no opera en estas condiciones no puede mantener su tasa especificada de flujo. Para garantizar su buen funcionamiento, al mismo tiempo que se recogen las muestras del captador se comprueba su flujo con un rotámetro y se anota cualquier incidencia en la hoja de registro de muestreo.

3.1.2 Cuantificación de alérgenos en partículas micrónicas

Existen dos formas de verificar la presencia de alérgenos en partículas micrónicas:

- Cuantificación inmunoquímica mediante la obtención de un eluido que contiene los alérgenos solubles depositados en un soporte expuesto a un volumen determinado de aire utilizando técnicas inmunoenzimáticas de inhibición (16).

- Visualización e inmunodetección directa de alergen en los filtros mediante microscopía electrónica de transmisión con quimioluminiscencia o densitometría (16). Fig. 4 y 5.

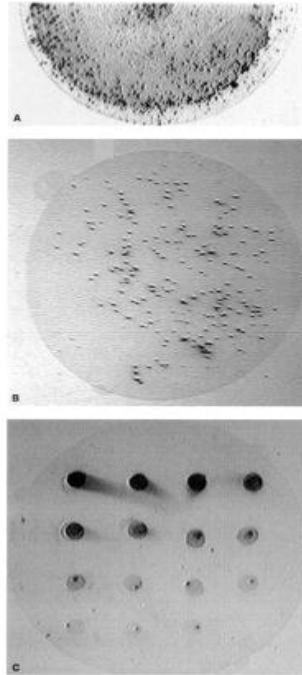


Fig. 4. Inmunodetección directa de alergen en los filtros. Tomado de Acevedo F, Vesterberg O, Bayard C. Visualization and quantification of birch-pollen allergens directly on air-sampling filters. *Allergy*, Volume 53 (6). June 1998; 594-601

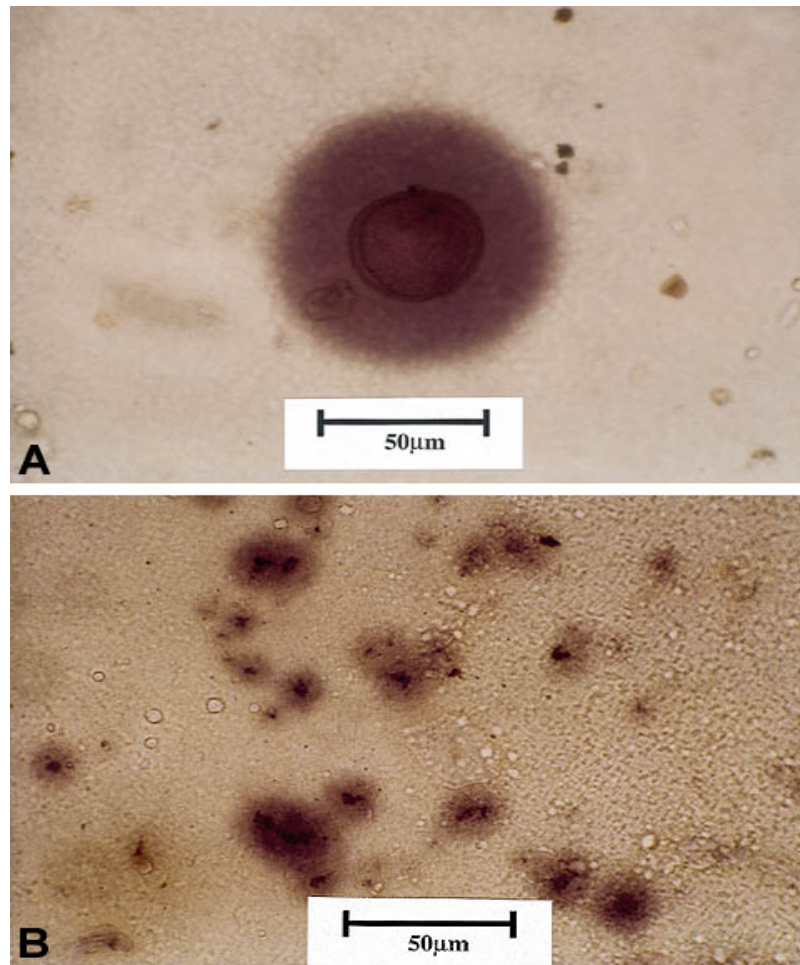


Fig. 5. Inmunodetección morfológica de granos completos y partículas micrónicas.
Tomado de Razmovski V, J Allergy Clin Immunol. 2000 Apr; 105(4):725-31.

Estos autores utilizaron en el colector cinta adhesiva sensible a la presión. Para la inmunodetección de alérgenos, anticuerpos monoclonales y un pool de sueros de pacientes sensibilizados. Encontraron que la intensidad del marcaje del halo que rodea al grano de polen y/o partículas micrónicas, es proporcional al nivel de IgE específica frente a *Lolium perenne*.

3.1.2.1 Alérgenos recombinantes

En los últimos años, la aplicación de las técnicas de Biología Molecular a la caracterización de los alérgenos, ha mejorado notablemente el conocimiento de estos. Ha permitido la determinación de la secuencia primaria completa de muchos de los alérgenos principales y secundarios de distintas fuentes, facilitando, por un lado, el conocimiento de su estructura química y esclareciendo muchas incógnitas planteadas como la existencia de proteínas homólogas e incluso de epítomos comunes en fuentes próximas o alejadas filogenéticamente, y por otro lado, permitiendo la obtención de los correspondientes alérgenos recombinantes, con características moleculares e inmunológicas idénticas a los del alérgeno natural y que, por tanto, serían aplicables tanto en diagnóstico como en el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

Una de las metas principales de la investigación en alergología es la mejora de las herramientas para el diagnóstico e inmunoterapia específica. Muchos de los extractos de alérgenos convencionales utilizados en diagnóstico *in vitro* e *in vivo* se obtienen de fuentes biológicas y constan de una mezcla de componentes alergénicos con grandes cantidades de productos indeseables que pueden interferir con el mismo (63). Además, contienen cantidades variables y desconocidas de alérgenos que pueden, a veces, estropearse por proteólisis u oxidación. Por el contrario, las mezclas de alérgenos purificados pueden ser utilizadas dentro de parámetros bien definidos, así como también pueden controlarse la concentración e integridad, impidiendo de este modo, los problemas relacionados con la variabilidad de la composición de diferentes lotes, bajas concentraciones de muchos componentes alergénicos o la prevención de nuevas sensibilizaciones (64).

Se han usado cuatro sistemas para la expresión recombinante de estos alérgenos:

- La bacteria *Escherichia coli*.
- La levadura *Pichia pastoris*.
- Células del insecto *Spodoptera frugiperda*, y
- plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Respecto a los alergenios utilizados en este estudio, se destacan las siguientes características:

Alergenios del grupo 1 de *Poaceae* (65):

Los alergenios del grupo 1 constituyen un conjunto de glicoproteínas relacionadas y de peso molecular comprendido entre 27 y 35 kDa. La homología entre especies próximas es elevada, así Lol p 1 presenta una homología del 91% con Phl p 1. La identidad de secuencia con especies más distantes es menor, así Cyn d 1 presenta únicamente una homología próxima al 50% con Lol p 1. Este hecho unido a la aparente ausencia de grupo 5 en *Cynodon*, hace que existan patrones específicos en alergia a *Cynodon*.

Funcionalmente los alergenios del grupo 1 pertenecen a la familia de la β -expansinas, enzimas que catalizan el crecimiento de las paredes celulares de la planta, y que muestran dominios catalíticos similares a los de la familia C1 de cisteinil proteasas.

Los alergenios del grupo 1 presentan una elevada concentración, solubilidad y una interacción débil con las paredes celulares, lo que favorece su biodisponibilidad y por lo tanto su alergenidad.

Alergenios del grupo 5 de *Poaceae* (65)

A diferencia del grupo 1, los alergenios del grupo 5 parecen ser exclusivos de la subfamilia de las *Pooideae*. Su tamaño molecular es ligeramente superior al grupo 1 (28-40 kDa) y no presentan glicosilaciones. Presentan actividad RNAsa y se sugiere su implicación en mecanismos de defensa. Una de las características más relevantes del grupo 5 es la elevada presencia de isoalergenios. El alergeno ha sido ampliamente estudiado en el caso del *Phleum*, donde está compuesto de dos grupos separados de isoalergenios Phl p 5a y Phl p 5b, de pesos moleculares aparentes de 31 kDa y 28 kDa, respectivamente. La variabilidad de los isoalergenios en una especie similar a la existente entre distintas especies. Aunque a nivel de capacidad de fijación de IgE no se han encontrado diferencias significativas entre isoalergenios, hay estudios que indican diferentes reconocimientos a nivel de células T8. Este hecho debe ser considerado en el diseño de alternativas terapéuticas basadas en el empleo de alergenios recombinantes. Como en el caso del grupo 1, la concentración en el

grano de polen es elevada y se asocia débilmente a partículas de almidón en aerosoles producidos tras la hidratación del polen, lo que justifica su alergenicidad.

Los alérgenos de los grupos I y V son los más inmunodominantes tanto por su mayor capacidad de unión a la IgE, como por el porcentaje de pacientes que presentan IgE reactiva frente a ellos.

- El 95% de los alérgicos a las gramíneas presentan IgE específica frente a alérgenos del grupo I.
- El 80% frente a alérgenos del grupo V.
- El 60-70% frente a alérgenos de los grupos II/III.
- El 75% frente a alérgenos del grupo IV.

Ole e 1 (65)

La respuesta inmunológica al extracto completo de polen de Oleaceae es muy heterogénea, destacando entre sus alérgenos *Ole e 1*, proteína glicosilada que se comporta como epitopo alérgico en aproximadamente el 62% de los pacientes.

Ole e 1 está considerado como el alérgeno principal del polen de Oleaceae. Este alérgeno constituye más del 10% del contenido total de proteínas del polen en las variedades de árboles de Oleaceae europaea, pero no existe en frutos, hojas ni ramas, de tal modo que estos tejidos no son capaces de inducir alergia.

La prevalencia alérgica de Ole e 1 varía según las diferentes zonas geográficas estudiadas y alcanza valores desde el 10% hasta un 55% en áreas donde el Oleaceae se cultiva extensamente como es la provincia de Jaén en donde junto con Ole e 1 es un alérgeno clínicamente importante.

Se ha purificado a partir del extracto de polen de Oleaceae y se ha determinado su secuencia de aminoácidos, conteniendo 145 aminoácidos con una masa molecular de 16.331 Da (determinada por espectrometría de masas). Debido a este carácter glicoproteico

presenta en PAGE-SDS un patrón complejo formado por dos bandas mayoritarias de 18,5 y 20 kDa, esta última glicosilada, y dos componentes minoritarios de 22 y 40 kDa que corresponden a una molécula con un mayor contenido en azúcares y a la forma dimérica respectivamente.

Ole e 1 presenta homologías y reactividad cruzada con pólenes de Oleaceae y con pólenes de no Oleaceae. Entre las Oleaceae, las proteínas homologas son de pólenes de Ligustrum, Fraxinus y Syringa, cuyos alérgenos respectivos son Fra e 1, Lig v 1 y Syr v 1. Entre las no Oleaceae, los alérgenos homólogos conocidos son de Plantago lanceolata (Pla l 1), de Chenopodium album (Che a 1), de Lolium perenne (Lol p 11) y de Phleum pratense (Phl p 11).

Asimismo, se ha demostrado que presenta actividad antigénica y alergénica, siendo capaz de provocar la liberación de histamina en los pacientes alérgicos.

La función biológica de Ole e 1 es desconocida. No presenta similitud con otras proteínas alergénicas, aunque su secuencia tiene un 36% de identidad con la de otras proteínas de las anteras del tomate y del polen del maíz, que se han involucrado en el crecimiento del tubo polínico; por esta razón, este alérgeno puede estar involucrado en funciones reproductivas.

Pla a 1 (65)

Hasta el momento únicamente se ha registrado dos alérgenos, denominados *Pla a 1* y *Pla a 2* respectivamente. Las fracciones alergénicas descritas oscilan entre 5 kDa y 66 kDa. El primer alérgeno aislado y caracterizado se realizó en los años setenta y correspondía a una glicoproteína de 22 kDa. En estudios posteriores, se considera la fracción de 17 kDa como un alérgeno mayor y es posteriormente registrado como *Pla a 1*. Esta proteína aparece en el 100% de los sueros de los pacientes monosensibilizados a *Platanaceae* y en el 83% de los pacientes polisensibilizados. Presenta un pI de 8,3 y la secuenciación de su cadena de aminoácidos N-terminal no presenta homología alguna, por el momento, con proteínas conocidas en los bancos de datos.

Cup a 1 (65)

Corresponde a un alérgeno de 43 kD, y es el alérgeno mayor de *Cupressus arizonica* y como los otros alérgenos de las Cupressaceae, tienen residuos glucosídicos. Las dificultades para conseguir la purificación y la estandarización de los extractos de Cupressaceae a fin de llevar a cabo una buena inmunoterapia específica a causa del bajo contenido en proteínas y la alta cantidad de azúcares, pudiendo estos últimos desempeñar un papel actuando como epítopos. Respecto a otros alérgenos, lo más interesante es que se ha demostrado que Cup a 3 se expresa en condiciones de alta contaminación atmosférica y lo que es más peculiar es que el polen obtenido en esas condiciones es más alérgico que el obtenido en casos de condiciones ideales carentes de contaminación.

3.1.2.2 Fuente de anticuerpos

Varias clases de anticuerpos son susceptibles de radioinmunoensayo. Un anticuerpo sirve como un anticuerpo de captura, y el otro tras su marcaje sirve como un anticuerpo detector. Si se adopta un sistema IgE para el estudio, es deseable obtener un pool grande, de por lo menos 500 ml de 10 a 20 donantes, para asegurar con éste volumen una cantidad suficiente de anticuerpos para completar el estudio a realizar. Para este tipo de investigaciones, se puede utilizar un pool policlonal de sueros así como detectar la actividad alérgica mediante anticuerpos monoclonales (66).

3.1.2.3 Inmunodetección de alérgenos

La demostración de la alérgenicidad de un producto biológico debe hacerse experimentalmente, demostrando la capacidad de la molécula (o la fuente de alérgeno) para inducir la respuesta IgE en las personas o animales, ya sea in vivo o in vitro. Habitualmente se asume esta capacidad de inducir dicha respuesta y se evalúa la capacidad de unión del alérgeno a la IgE del suero de pacientes alérgicos. Para el caso del extracto alérgico, esto se hace con pruebas cutáneas, RAST o cualquiera de las variantes de ELISA (64).

Para la cuantificación de los alérgenos del estudio se ha utilizado la técnica ELISA Doble Fase, más conocida como ELISA doble Sandwich por quedar el antígeno del extracto obtenido, atrapado entre dos anticuerpos, según el siguiente esquema.

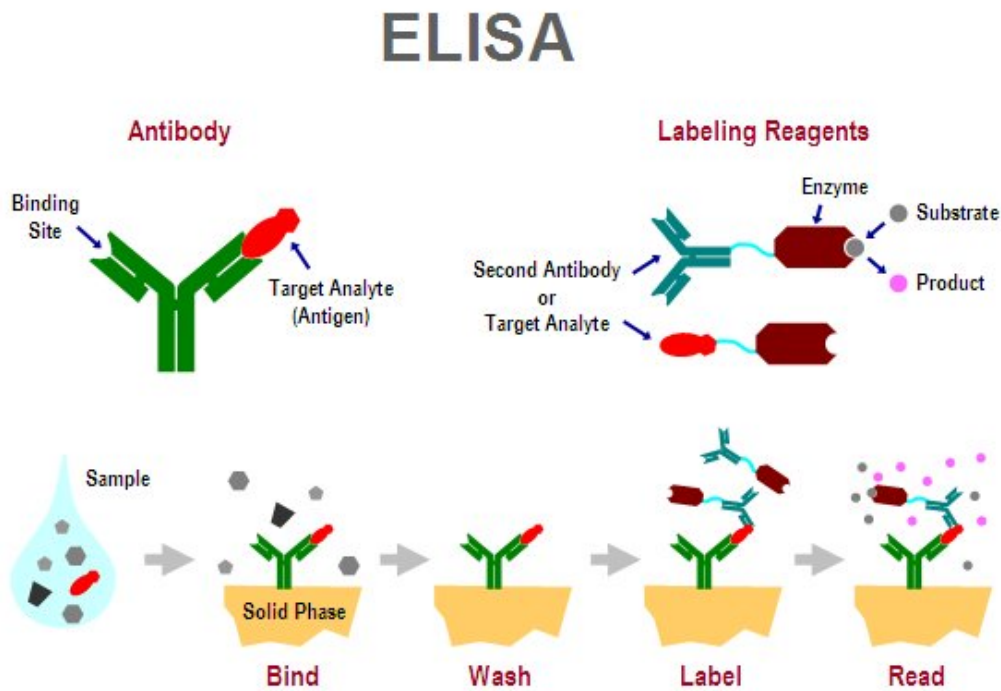


Fig. 6. Esquema de ELISA “doble sándwich”.

Esta técnica permite la detección o cuantificación del antígeno. En este caso es el anticuerpo el inmovilizado en la cápsula microtiter. La muestra con antígenos se añade y se deja reaccionar con el anticuerpo enlazado. Después del lavado, un segundo anticuerpo unido a enzima específico para un epítipo diferente del antígeno se añade y se deja reaccionar con el antígeno enlazado. Después de un nuevo lavado se añade el sustrato y se mide el producto de reacción coloreado.

3.1.3 Necesidades actuales en el estudio de partículas micrónicas

El hecho de que los alergenos pueden asociarse a distintas partículas y no solamente a formas identificables morfológicamente, ha dado un lugar relevante a los métodos inmunoquímicos para la cuantificación de su actividad alérgica.

Si tenemos en cuenta que los alergenos pueden presentarse en formas amorfas, difíciles de identificar, y que los procesos de sensibilización y los síntomas de las enfermedades alérgicas se correlacionan con la cantidad de alergen presente en el aire, se comprende la necesidad de obtener un método inmunoquímico que permita cuantificar la cantidad de alergen presente en el aire en un momento dado.

Investigación futura sobre este tópico podría conducir a métodos de predicción, tales como los asociados con ciertas tormentas que son potencialmente peligrosas para los pacientes asmáticos. A medio plazo las técnicas inmunológicas podrían desplazar el tradicional recuento de pólenes pero este último tendrá por algún tiempo un papel relevante desde un punto de vista clínico para los alergólogos.

4 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Por lo expuesto previamente se ve clara la necesidad de investigación básica en el muestreo de pequeñas partículas en la atmósfera y de las técnicas inmunoquímicas de cuantificación para el desarrollo de un método rápido y asequible que pueda ser aplicado rutinariamente para complementar la información del recuento de pólenes. Esto es especialmente importante en los días húmedos, cuando el recuento de polen no da una buena indicación del contenido alérgico del ambiente.

El presente estudio describe por primera vez la concentración atmosférica de granos de polen y alergen de Poaceae, Oleaceae, Platanaceae y arizónica durante un periodo de año y medio. Madrid es un buen ejemplo de un intenso pero corto periodo de polinización de Poaceae.

5 OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Para un mejor entendimiento de la fisiopatología del asma bronquial, los estudios aerobiológicos de las últimas dos décadas, han dirigido su atención al estudio de partículas aerovagantes de tamaño menor que los granos de polen con actividad alérgica capaces de inducir broncoconstricción.

Sobre el origen de estas partículas quedan muchos aspectos por esclarecer.

Los objetivos de esta investigación han sido:

- Cuantificar la presencia de actividad alérgica dependiente de Poaceae, Oleaceae, Platanaceae y Cupressaceae en la atmósfera de Madrid y establecer sus relaciones con el respectivo recuento atmosférico de granos de polen.
- Valorar la influencia de las variables meteorológicas y de contaminación sobre los alérgenos.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.3 Recuento de pólenes

El recuento de pólenes se realizó de acuerdo a técnica previamente descrita con un captador volumétrico Burkard (Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, Herst, U.K.) Fig. 7. El periodo de recolección fue desde el 23 de marzo de 2009 al 27 de Julio de 2010. El colector está instalado en la azotea del Centro de Alergología Doctor Subiza, a 20 m de altura y está localizado al este del área urbana de Madrid (40° 26' N; 3° 40' E, 640 m sobre el nivel del mar), sin parques o jardines a su alrededor. El aparato succiona 10 litros de aire cada minuto ($14.4 \text{ m}^3/24 \text{ horas}$) a través de una apertura (14x2 mm) permanentemente orientada a la dirección del viento gracias a una veleta. Las partículas aerotransportadas caen en una cinta localizada cerca de la apertura. Esta cinta está cubierta con una delgada y uniforme capa de vaselina la cual se fija alrededor de un tambor que rota los 7 días de la semana por un mecanismo de reloj a una velocidad de 2 mm/hora. Cada semana esta cinta se retira y se corta en segmentos de 48 mm de longitud correspondiendo cada uno a 1 día de muestreo. Cada segmento se monta en un portaobjetos y se cubre con un cubreobjetos de 20x50 mm que se adhiere a la cinta por medio de 3 gotas de una solución de gelatina de glicerol y fenol a 40° C. Para estudiar los pólenes se utilizó un microscopio de inmersión (x10 ocular, x100 objetivo y con un campo de 0,18 mm). El recuento hecho en este segmento de 48 mm es multiplicado por un factor de conversión de 5.4, lo que nos da el promedio de granos de polen por metro cúbico de aire en 24 horas (67).

La identificación de los pólenes se basó en el atlas de referencia y fotografías descritas por Hyde y Adams (68).

Se estableció el periodo principal de polinización (PPP): Periodo de máxima producción de polen. Para su cálculo, en esta estudio se ha aplicado en principio el concepto de Andersen y Torben (69), es decir, desde el día en el cual la suma de concentraciones diarias de polen (porcentaje acumulado) alcanza, por término

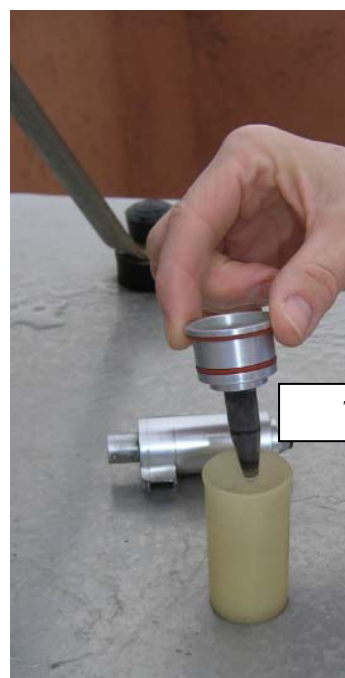
medio, el 2,5% de la suma total hasta cuando la suma alcanza 97,5%, o sea, el período con un 95% de la cantidad total de polen observado.

6.3 Captador de bajo volumen. Burkard ciclón (Fig. 7)

El colector está instalado en la misma azotea del Centro de Alergología Doctor Subiza, a 20 m de altura y está localizado al este del área urbana de Madrid (40° 26' N; 3° 40' E, 640 m sobre el nivel del mar), sin parques o jardines a su alrededor, a 2 m de distancia del colector de pólenes Burkard (Fig. 7). Las muestras se recogen diariamente del ciclón en un tubo Eppendorf, etiquetado y perfectamente identificado con un código numérico. Las muestras, una vez recogidas, han sido llevadas inmediatamente a temperatura de congelación, conservándolas congeladas hasta su fecha de utilización para la extracción de alérgenos.



Fig. 7. Captador de pólenes tipo Burkard a la derecha y captador de alérgenos Burkard ciclón a la izquierda y en las dos imágenes de abajo.



Tubo de Eppendorf

Colocación de tubo de Eppendorf.

6.3 Cuantificación de los alérgenos Phl p 1, Phl p 5, Ole e 1, Pla a 1 u Cup a 1 de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* respectivamente.

Para la cuantificación de los alérgenos de estos pólenes se ha utilizado la técnica ELISA Doble Fase, más conocida como ELISA doble Sandwich por quedar el antígeno atrapado entre dos anticuerpos, haciendo una extracción previa de las muestras mediante el siguiente método:

6.3.1 Extracción de los alérgenos de las muestras.

Las muestras recogidas en viales Eppendorf de 1,5 mL, procedentes del captador ciclón Burkard, se extrajeron utilizando el método descrito por Takahashi et al, con ligeras modificaciones (71).

- Descongelación de la muestra a temperatura ambiente.
- Resuspensión de la muestra en 120 µl de tampón de extracción (50 mM tampón fosfato pH 7,4; 150 mM NaCl; 125 mM bicarbonato amónico; 3 mM EDTA; 0,005% tween 20).
- Extracción durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Centrifugación a 4000 rpm durante 10 min.
- Separación del sobrenadante y del precipitado, y guardar ambos a -20°C.

6.3.2 Tampón de extracción (medidas para 500 ml).

Preparamos 50 mL Tampón Fosfato Sódico 500 mM a pH 7,0.
20 mL de NaH_2PO_4 0,5 M (Ácido).

30 mL de Na_2HPO_4 0,5 M (Base, tarda mucho en disolverse).

Siempre hay que dejar en el vaso de precipitados la base y se añade el ácido. Ajustamos el pH o con clorídico o con sosa.

Como necesitamos 500 mL de tampón fosfato sódico 50 mM, hacemos una dilución 1:10. El pH lo hemos ajustado a 7,0 en lugar de 7,4 porque al añadir el NaCl, EDTA y el bicarbonato amónico el pH subirá un poco.

Añadimos 450 mL de agua miliQ (*enrasar a 500 mL*).

Añadimos:

0,15 M de NaCl (solución a 4 M, añadimos 18,75 mL).

0,003 M de EDTA (Solución 0,5 M, añadimos 3 mL).

0,125 M de Bicarbonato Amónico (4,94 g).

Preparar el volumen de tampón de extracción añadiendo el Tween 20 a la concentración deseada. Generalmente el tampón lleva Tween 20 al 0,005 % (5 µL/100 mL).

Se adquirieron al Laboratorio Bial Aristegui los elementos necesarios para la inmunodetección de alérgenos: anticuerpo monoclonal de captura, poli o monoclonal biotinilado para detección y estándar para ELISA del alérgeno purificado.

6.4 Estándar para ELISA del alérgeno purificado:

Se trata de alérgenos naturales que fueron purificados a partir de extractos de polen de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae*, previamente descongelados, mediante filtración en gel Sephadex G-75 (Pharmacia) equilibrado en bicarbonato amónico 0,2 M, pH 8,0. Las fracciones que contenían un mismo alérgeno se juntaron, liofilizaron y se aplicaron en una cromatografía de alta resolución en fase reversa, empleándose como sistema de elución un gradiente lineal (0-60%) de acetonitrilo en 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). El contenido en proteínas fue estimado mediante el método de Bradford (70).

6.5 Anticuerpos monoclonales y antisueños policlonales

Mediante inmunización de ratones BALB/c con estos alérgenos purificados se obtienen células de bazo que se fusionan con células SP2O de mieloma en presencia de polietilén glicol. Los hibridomas positivos se identificaron mediante ELISA con placas revestidas del alérgeno natural correspondiente con posterior subclonación por dilución limitante.

Se consiguieron varios anticuerpos monoclonales con especificidad para estos alérgenos. De los anticuerpos, solamente los más reactivos y suero de conejo policlonal se purificaron y etiquetaron con biotina.

El suero policlonal se obtuvo mediante inmunización de conejos Nueva Zelanda con estos alérgenos. Para la obtención de los anticuerpos, el sobrenadante del cultivo de hibridomas o el suero de conejo anti-alérgeno se purificó mediante cromatografía de afinidad con Sefarosa-proteína G (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). La inmunoglobulina G de conejo purificada se marcó con biotina usando el kit de biotilación proteica enzimática quimioluminiscente (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). La detección de isotipos se hizo con el kit IsoStrip (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), de acuerdo al manual de instrucciones del fabricante.

Los anticuerpos se prepararon a partir de las siguientes concentraciones:

Anticuerpos de Captura:

Contienen azida sódica al 0,1%. Se almacenó a 4°.

Anti-Phl p 1. Anticuerpos monoclonales 7A8 y 9F6 preparados cada uno a 2,5 µg/ml en PBS

Anti-Phl p 5. Anticuerpos monoclonales 10B1 y 10C12 preparados cada uno a 2,5 µg/ml en PBS

Anti-Ole e 1. Anticuerpo monoclonal 5A3 preparado a una concentración de 5 µg/ml en PBS

Anti-Cup a 1. Anticuerpo monoclonal 3D2 preparado a una concentración de 5 µg/ml en PBS

Anti-Pla a 1. Anticuerpo monoclonal 5C1 preparado a una concentración de 2,5 µg/ml en PBS

Rango de las rectas patrón:

Phl p 1. 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 16; 8 ng/ml en PBS-T-B.

Phl p 5. 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,16; 0,08; 0,04; 0,02 ng/ml en PBS-T-B.

Ole e 1. 25; 10; 5; 1,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1 ng/ml en PBS-T-B.

Cup a 1. 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,6; 0,8 ng/ml en PBS-T-B.

Pla a 1. 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,6; 0,8; 0,4 ng/ml en PBS-T-B.

Las proteínas diluidas en PBS-T-B a la concentración adecuada en cada caso y almacenadas a -80°C en alícuotas de un solo uso.

El ensayo se basó en el uso de anticuerpos monoclonales específicos para los alérgenos de estudio para la captura, y otro marcado con biotina para su detección. Los alérgenos purificados se utilizaron para construir una curva de calibrado. El contenido de los alérgenos en la atmósfera cuantificado en los extractos obtenidos del eluido del tubo de Eppendorf, se calculó por interpolación en la parte lineal de la curva.

Anticuerpos biotinilados

Contienen azida sódica al 0,2%. Se almacenó a 4°C.

anti-Phl p 1. Anticuerpo monoclonal 9A4 preparado a 0,4 µg/ml en PBS-T-B.

anti-Phl p 5. Anticuerpos policlonales preparados a 0,125 µg/ml en PBS-T-B.

anti-Ole e 1. Anticuerpos policlonales preparados a 0,25 µg/ml en PBS-T-B.

anti-Cup a 1. Anticuerpos policlonales preparados a 0,312 µg/ml en PBS-T-B.

anti-Pla a 1. Anticuerpos policlonales preparados a 0,625 µg/ml en PBS-T-B.

Solución sustrato de OPD

Disolver la pastilla de urea-H₂O₂ en 20 ml de H₂O y en el último momento disolver la pastilla de OPD.

Preparación de reactivos:

PBS

NaCl	8,00 g	
KCl	0,20 g	
KH ₂ PO ₄	0,20 g	
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,44 g	Ajustar a pH 7,2-7,3

Solución PBS-T

PBS	1 litro
Tween 20	0,5 ml

Solución PBS-T-B

PBS:	1 litro
Tween 20	0,5 ml
BSA	10 g

6.6 Elisa doble fase. Protocolo

- Tapizamos las placas de ELISA (Greiner, Frickenhausen, Germany) añadiendo 100 µL/pocillo del correspondiente anticuerpo monoclonal (mAb) diluido en tampón PBS. Incubar toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda (podemos utilizar un tupper que contenga en el fondo una servilleta mojada). El anticuerpo monoclonal se añade con la finalidad de que las proteínas (nuestro alérgeno) se pegue a la placa y no pierda la conformación. También se añade, porque la placa tiene un rango de saturación, es decir se puede pegar un número limitado de proteínas, como en nuestra muestra pueden existir más proteínas y puede que la nuestra no sea la mayoritaria, al añadir el mAb aseguramos que toda nuestra proteína se pegue a la placa.

- Vaciar el contenido de las placas (un movimiento brusco para que caiga bien todo el contenido). Añadir a las placas 200 μ L/pocillo de tampón PBS-BSA-T (PBS + BSA al 1% + Tween 20 al 0,05%), e incubar 1 hora a 37 °C. El tampón que utilizamos en este paso (PBS-BSA-T) contiene BSA (Albúmina Sérica Bovina) y lo utilizamos para bloquear la placa y evitar que cuando añadamos nuestra proteína (alérgeno) se pegue en zonas inespecíficas. Podríamos utilizar también gelatina o leche con este fin.
- Vaciar el contenido de las placas enérgicamente y añadir 100 μ L/pocillo de la recta patrón (a partir de un stock con una concentración conocida de nuestra proteína/alérgeno hacemos diluciones para obtener diferentes concentraciones) y de los extractos problemas diluidos con tampón PBS-BSA-T (según cada alérgeno y lo sensible que sea el ELISA en cada caso haremos diluciones 1:10, 1:20, 1:30, 1:50, 1:100...).
- Vaciar el contenido de las placas enérgicamente y lavar tres veces con 200 μ L/pocillo de tampón PBS-T (PBS + Tween 20 al 0,05%). Es conveniente que todos los lavados se hagan durante el mismo tiempo, sobre todo si tenemos varias placas. Es suficiente con 1 minuto.
- Añadir 100 μ L/pocillo del anticuerpo monoclonal o policlonal o del antisuero correspondiente marcado con biotina. Este anticuerpo o antisuero se añadirá a la dilución correspondiente con tampón PBS-B-T. Incubar 1 hora a 37 °C. En este paso conseguiremos que la estreptavidina, que añadiremos en el siguiente paso, se una a la biotina. También podemos utilizar anticuerpos marcados directamente con estreptavidina, pero lo que conseguimos con la biotina es amplificar la señal, ya que de este modo varias moléculas de estreptavidina se pueden unir a la biotina y de la otra forma sólo se uniría una molécula de estreptavidina. Este anticuerpo monoclonal biotinado no compite con el primer anticuerpo monoclonal que utilizamos para tapizar la placa porque reconoce a un epítipo diferente.
- Vaciar el contenido de las placas enérgicamente y lavar tres veces con 200 μ L/pocillo de tampón PBS-T (PBS + Tween 20 al 0,05%).

- Añadir 100 µL/pocillo de estreptavidina conjugada a peroxidasa (250 ng/mL en tampón PBS-BSA-T; Sigma, S-5512). Incubar 1 hora a 37 °C.
- Vaciar el contenido de las placas enérgicamente y lavar tres veces con 200 µL/pocillo de tampón PBS-T (PBS + Tween 20 al 0,05%).
- Añadir 200 µL/pocillo de una solución de o-fenilendiamina (Sigma-Fast™ o-phenylenediamine dihydrochloride tablet sets; Sigma P-9187) y mantener las placas a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. La o-fenilendiamina es el sustrato de la peroxidasa que añadimos en el paso anterior conjugada a la estreptavidina y es muy tóxica, hay que utilizar guantes para manejarla y prepararla justo en el momento de uso, porque se oxida con la luz. Es además importante utilizar recipientes nuevos tanto para prepararlo, para evitar que exista alguna partícula que nos de color, simplemente seguir las instrucciones de uso. La peroxidasa es una enzima que oxida a compuestos dadores de hidrógeno como fenoles (guayacol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina), por medio de la formación de peróxidos (H₂O₂), debido a esta reacción veremos la formación de color amarillo más o menos intenso.
- Parar la reacción añadiendo 50 µL/pocillo de H₂SO₄ 3 M.
- Medir la Absorbancia a 492 nm.
- Representar la Absorbancia obtenida versus log de la concentración (ng/mL), e interpolar los valores obtenidos para nuestras muestras en la parte lineal de la curva estándar.

En todos los casos el Tween 20 utilizado es de la marca comercial Scharlau y Tween para síntesis.

Se estimó el contenido alérgico en 284 alícuotas de eppendorf distribuidos a lo largo de todo el año y medio del estudio.

Plantilla Phl p 1

	1	2	3	4
A	Blanco		16 ng/ml	
B	Blanco-Po		8 ng/ml	
C	1000 ng/ml		Muestra 1	Muestra 7
D	500 ng/ml		Muestra 2	Muestra 8
E	250 ng/ml		Muestra 3	Muestra 9
F	125 ng/ml		Muestra 4	Muestra 10
G	62,5 ng/ml		Muestra 5	Muestra 11
H	31,25 ng/ml		Muestra 6	Muestra 12

Plantilla Phl p 5

	1	2	3	4
A	Blanco		0,04 ng/ml	
B	Blanco-Po		0,02 ng/ml	
C	2,5 ng/ml		Muestra 1	Muestra 7
D	1,25 ng/ml		Muestra 2	Muestra 8
E	0,625 ng/ml		Muestra 3	Muestra 9
F	0,3125 ng/ml		Muestra 4	Muestra 10
G	0,16 ng/ml		Muestra 5	Muestra 11
H	0,08 ng/ml		Muestra 6	Muestra 12

Plantilla Ole e 1

	1	2	3	4
A	Blanco		0,25 ng/ml	
B	Blanco-Po		0,1 ng/ml	
C	25 ng/ml		Muestra 1	Muestra 7
D	10 ng/ml		Muestra 2	Muestra 8
E	5 ng/ml		Muestra 3	Muestra 9
F	2,5 ng/ml		Muestra 4	Muestra 10
G	1 ng/ml		Muestra 5	Muestra 11
H	0,5 ng/ml		Muestra 6	Muestra 12

Plantilla Pla a 1

	1	2	3	4
A	Blanco		0,8 ng/ml	
B	Blanco-Po		0,4 ng/ml	
C	50 ng/ml		Muestra 1	Muestra 7
D	25 ng/ml		Muestra 2	Muestra 8
E	12,5 ng/ml		Muestra 3	Muestra 9
F	6,25 ng/ml		Muestra 4	Muestra 10
G	3,125 ng/ml		Muestra 5	Muestra 11
H	1,6 ng/ml		Muestra 6	Muestra 12

Plantilla Cup a 1

	1	2	3	4
A	Blanco		1,6 ng/ml	
B	Blanco- Po		0,8 ng/ml	
C	100 ng/ml		Muestra 1	Muestra 7
D	50 ng/ml		Muestra 2	Muestra 8
E	25 ng/ml		Muestra 3	Muestra 9
F	12,5 ng/ml		Muestra 4	Muestra 10
G	6,25 ng/ml		Muestra 5	Muestra 11
H	3,125 ng/ml		Muestra 6	Muestra 12

6.7 Obtención de los datos meteorológicos y de contaminación

Esta información ha sido facilitada por el Instituto Nacional de Meteorología y la Secretaría de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid (lluvia, humedad relativa, velocidad del viento, dirección del viento, nivel de partículas, O_3 , SO_2 , NO_2 , CO y Benceno), correspondiente a los años 2009 y 2010 de las estaciones de Barajas y Escuelas Aguirre respectivamente, las dos estaciones más cercanas a los colectores.

6.8 Tratamiento estadístico de los datos

Para el tratamiento estadístico de los datos se ha utilizado el paquete informático SPSS versión 17 para Windows Xp. SPSS Ibérica, an IBM Company, Plaza de Colón 2 – Torre de Colón 2 – Torre II Planta 16. 28046 Madrid.

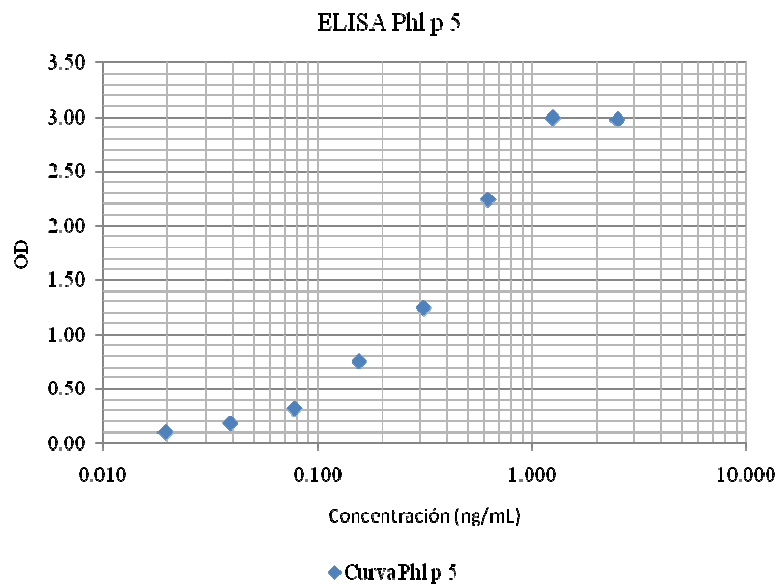
Se utilizaron coeficientes de regresión lineal (rL) de Pearson El valor de los coeficientes se consideró como significativo si el valor de la p era menor de 0.05.

7 RESULTADOS

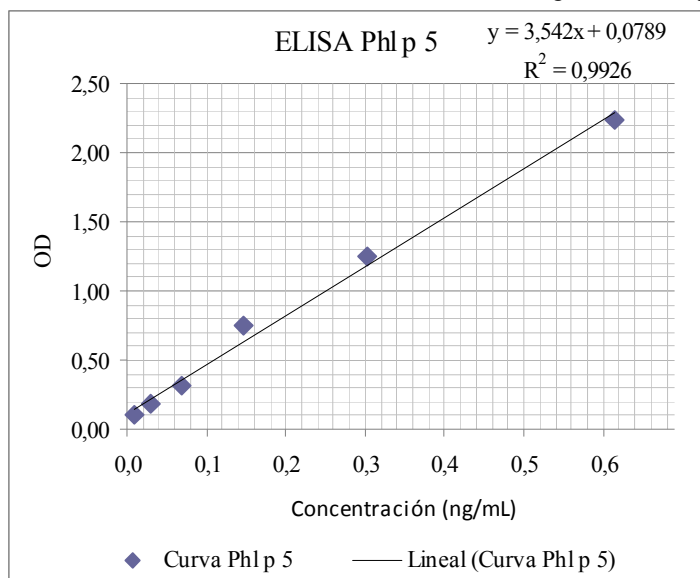
7.1 Curvas de calibración para la cuantificación de alergen.

En las Figuras 8, 9, 10, 11 y 12 se presentan, las curvas de calibración de Phl p 5, Phl p 1, Ole e 1, Pla a 1 y Cup a 1, junto con las respectivas rectas de regresión sobre la cual se extrapolan las absorbancias de los eluidos obtenidos de las muestras de la atmósfera de Madrid durante el periodo de estudio (23/3/2009- 27/7/2010). Las rectas van acompañadas de sus respectivas ecuaciones.

Fig. 8. ELISA Phl p 5



Curva dosis respuesta del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para Phl p 5. 492 OD indica la absorbancia a 492 nm vs concentración de proteína. Abajo recta de regresión con su ecuación.



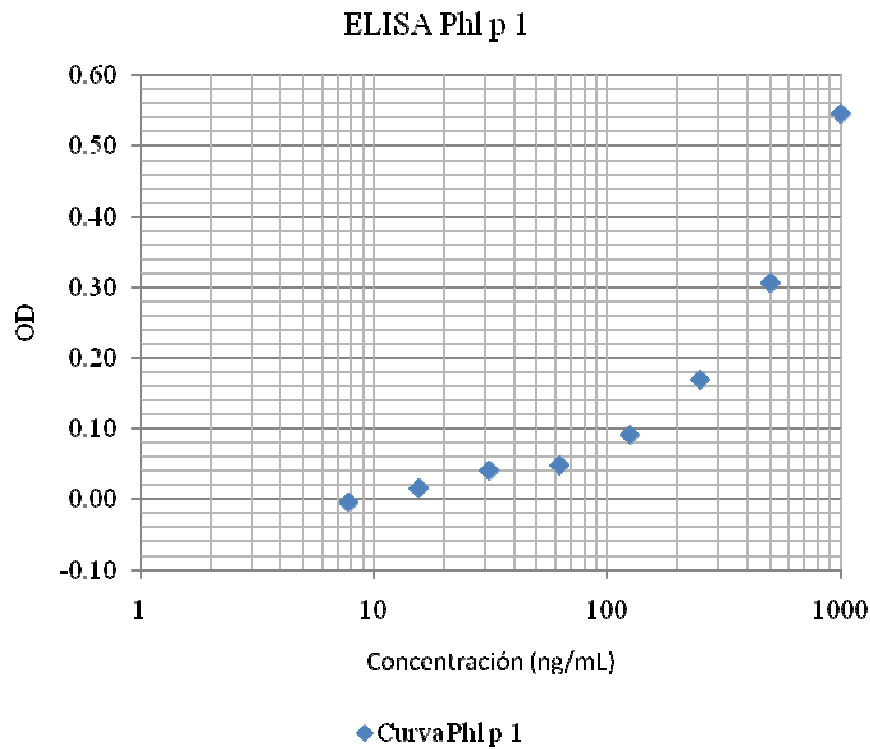
Curva Phl p 5

Concentración (ng/mL)	A1	A2	Media	Media - Blanco
2,500	3,233	3,208	3,221	2,980
1,250	3,299	3,174	3,237	2,996
0,625	2,360	2,608	2,484	2,243
0,313	1,455	1,514	1,485	1,244
0,156	0,956	1,027	0,992	0,751
0,078	0,539	0,575	0,557	0,316
0,039	0,416	0,425	0,421	0,180
0,020	0,937	0,340	0,340	0,099
0	0,244	0,238	0,241	

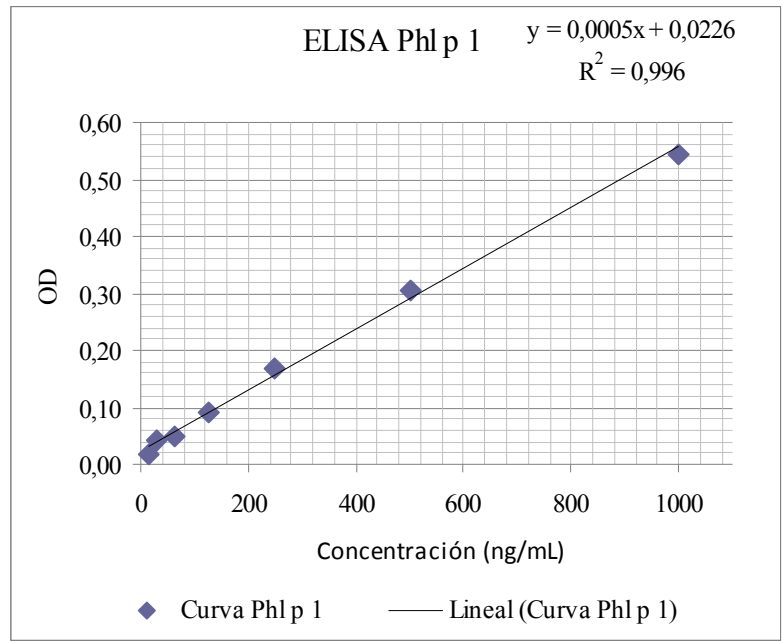
b	a	R
3,542	0,0789	0,9926

Puntos de curva con sus correspondientes absorbancias y coeficientes de la ecuación.

Fig. 9. ELISA Phl p 1



Curva dosis respuesta del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para Phl p 1. 492 OD indica la absorbancia a 492 nm vs concentración de proteína. Abajo recta de regresión con su ecuación.



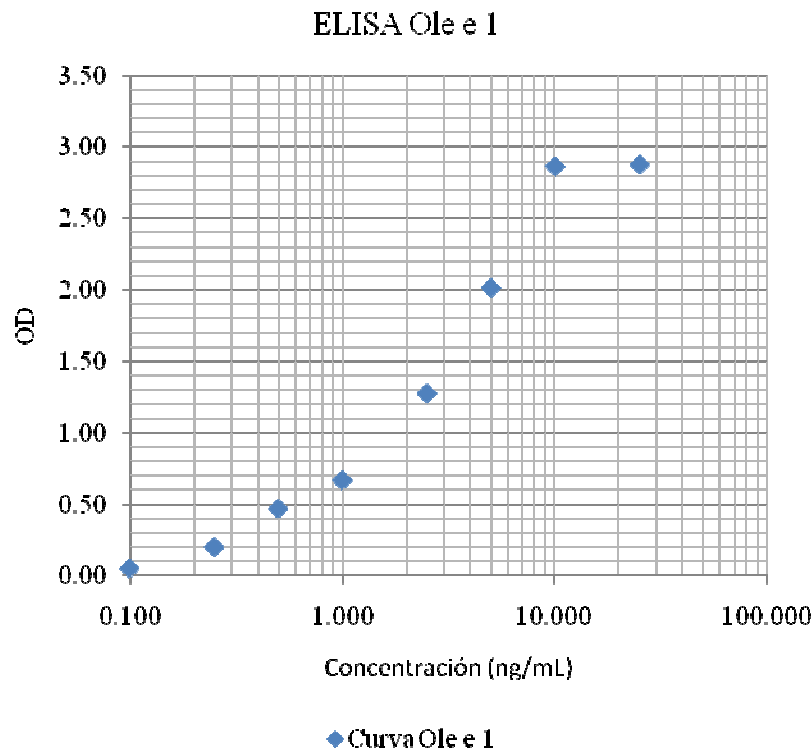
Curva Phl p 1

Concentración (ng/mL)	A1	A2	Media	Media - Blanco
1000	0,812	0,750	0,781	0,546
500	0,563	0,521	0,542	0,307
250	0,422	0,388	0,405	0,170
125	0,338	0,316	0,327	0,092
62,500	0,298	0,270	0,284	0,049
31,250	0,288	0,265	0,277	0,041
15,625	0,250	0,253	0,252	0,016
7,813	0,235	0,228	0,232	-0,004
0	0,240	0,231	0,236	

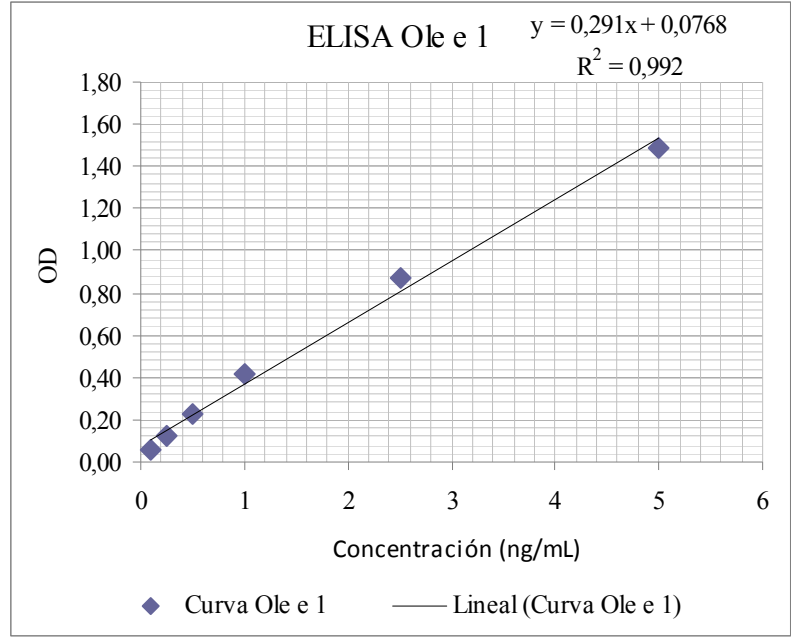
b	a	R
0,0005	0,0226	0,996

Puntos de curva con sus correspondientes absorbancias y coeficientes de la ecuación.

Fig. 10. ELISA Ole e 1



Curva dosis respuesta del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para Ole e 1. 492 OD indica la absorbancia a 492 nm vs concentración de proteína. Abajo recta de regresión con su ecuación.



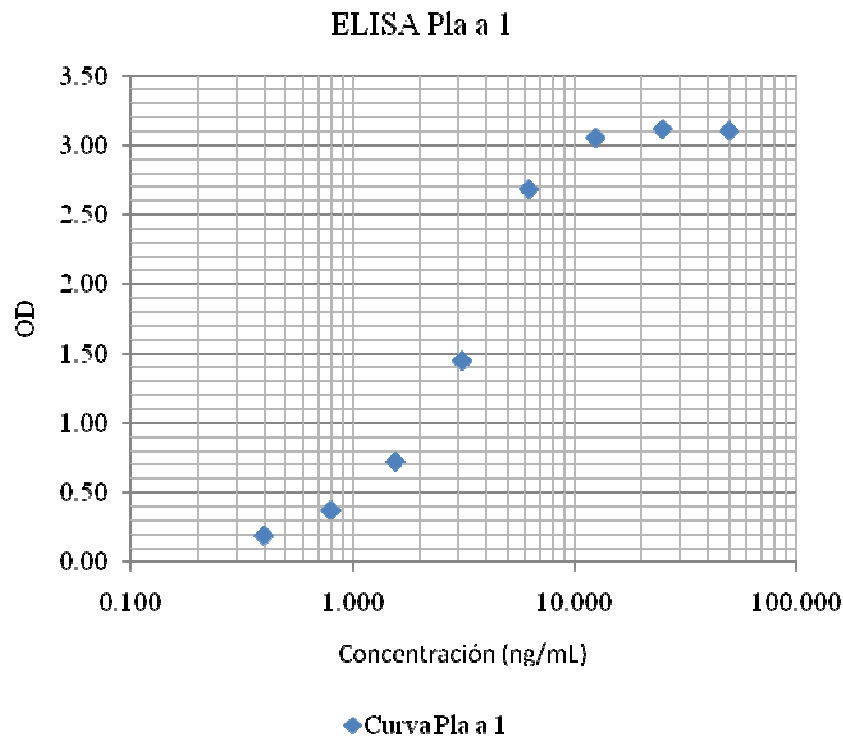
Curva Ole e 1

Concentración (ng/mL)	A1	A2	Media	Media - Blanco
25,000	2,805	2,833	2,819	2,739
10,000	2,318	2,354	2,336	2,256
5,000	1,544	1,598	1,571	1,491
2,500	0,933	0,968	0,951	0,870
1,000	0,498	0,503	0,501	0,420
0,500	0,305	0,311	0,308	0,228
0,250	0,194	0,204	0,199	0,119
0,100	0,129	0,142	0,136	0,055
0	0,078	0,083	0,081	

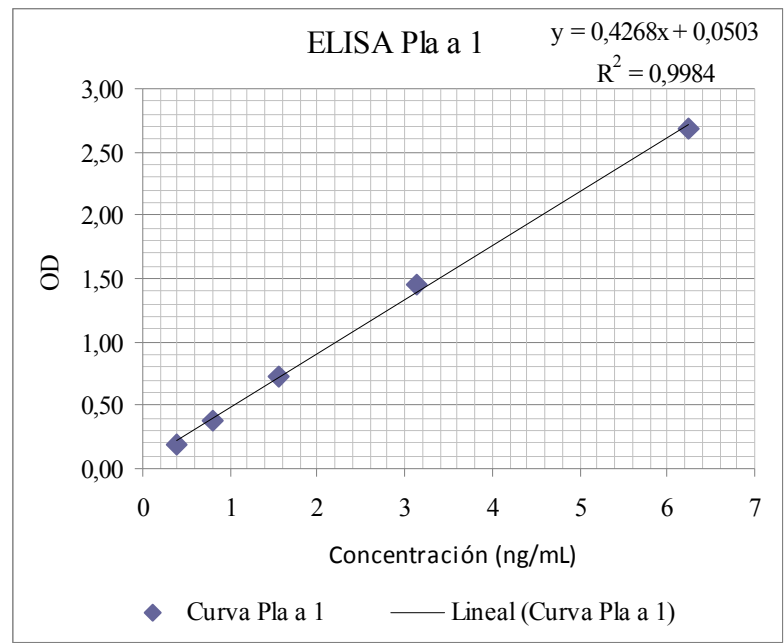
b	a	R
0,291	0,0768	0,992

Puntos de curva con sus correspondientes absorbancias y coeficientes de la ecuación.

Fig. 11. ELISA Pla a 1



Curva dosis respuesta del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para Pla a 1. 492 OD indica la absorbancia a 492 nm vs concentración de proteína. Abajo recta de regresión con su ecuación.



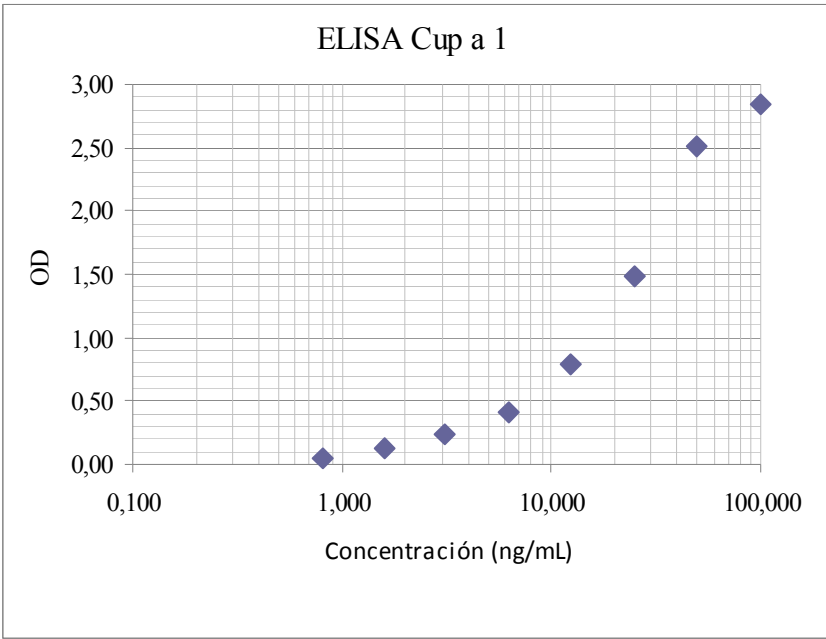
Curva Pl a 1

Concentración (ng/mL)	A1	A2	Media	Media - Blanco
50,000	3,187	3,364	3,276	3,107
25,000	3,375	3,199	3,287	3,118
12,500	3,318	3,131	3,225	3,056
6,250	2,774	2,936	2,855	2,686
3,125	1,479	1,761	1,620	1,451
1,563	0,830	0,962	0,896	0,727
0,800	0,516	0,571	0,544	0,375
0,400	0,362	0,363	0,363	0,194
0	0,165	0,173	0,169	

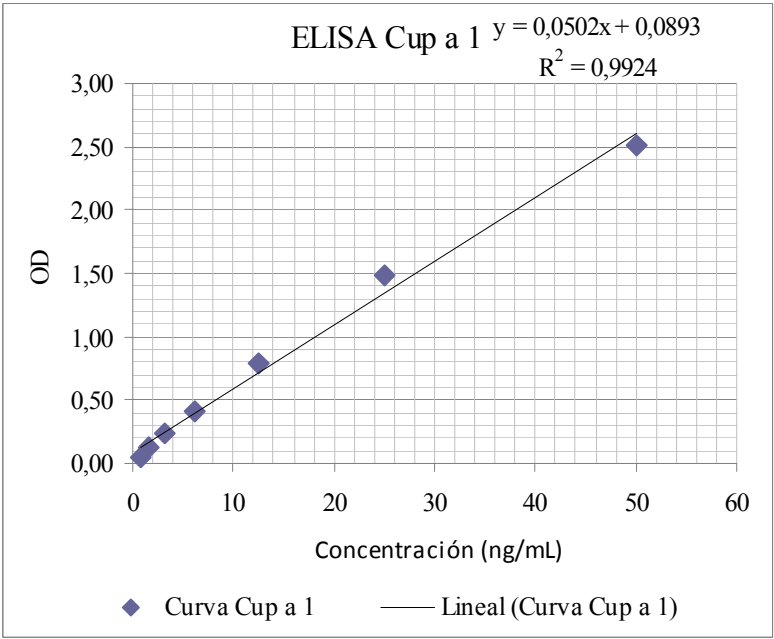
b	a	R
0,4268	0,0503	0,9984

Puntos de curva con sus correspondientes absorbancias y coeficientes de la ecuación.

Fig. 12. ELISA Cup a 1



Curva dosis respuesta del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para Cup a 1. 492 OD indica la absorbancia a 492 nm vs concentración de proteína. Abajo recta de regresión con su ecuación.



Curva Cup a 1

Concentración (ng/mL)	A1	A2	Media	Media - Blanco
100,000	3,057	3,057	3,057	2,835
50,000	2,767	2,710	2,739	2,516
25,000	1,722	1,680	1,701	1,479
12,500	1,033	0,979	1,006	0,784
6,250	0,669	0,606	0,638	0,415
3,125	0,465	0,449	0,457	0,235
1,600	0,350	0,344	0,347	0,125
0,800	0,280	0,274	0,277	0,055
0	0,225	0,220	0,223	

b	a	R
0,0502	0,0893	0,9924

Puntos de curva con sus correspondientes absorbancias y coeficientes de la ecuación.

Todas estas curvas presentan un coeficiente de correlación R^2 por encima de 0,90 que las hacen idóneas para el propósito del estudio.

En la curva de calibrado de Ole e 1, el límite de detección fue de 0,5 ng/ml, habiéndose obtenido entre los tres ensayos realizados que se han debido llevado a cabo por saturación de la muestra, un coeficiente de variación <20%, siendo con ello posible la cuantificación de alergenitos con una técnica cuya puesta a punto tiene una alta sensibilidad para la detección de alergenitos.

7.2 Cuantificación de alérgenos versus el correspondiente recuento de polen.

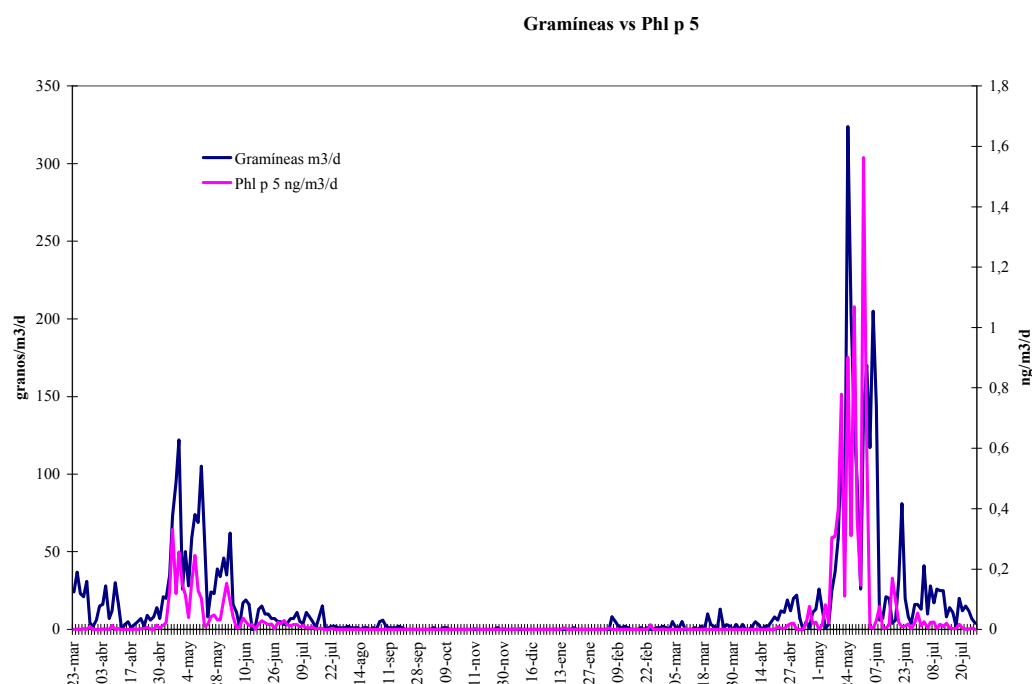


Fig. 13. Presencia del alérgeno Phl p 5 y pólenes de *Poaceae*. $r: 0,70$, $p=0,00001$.

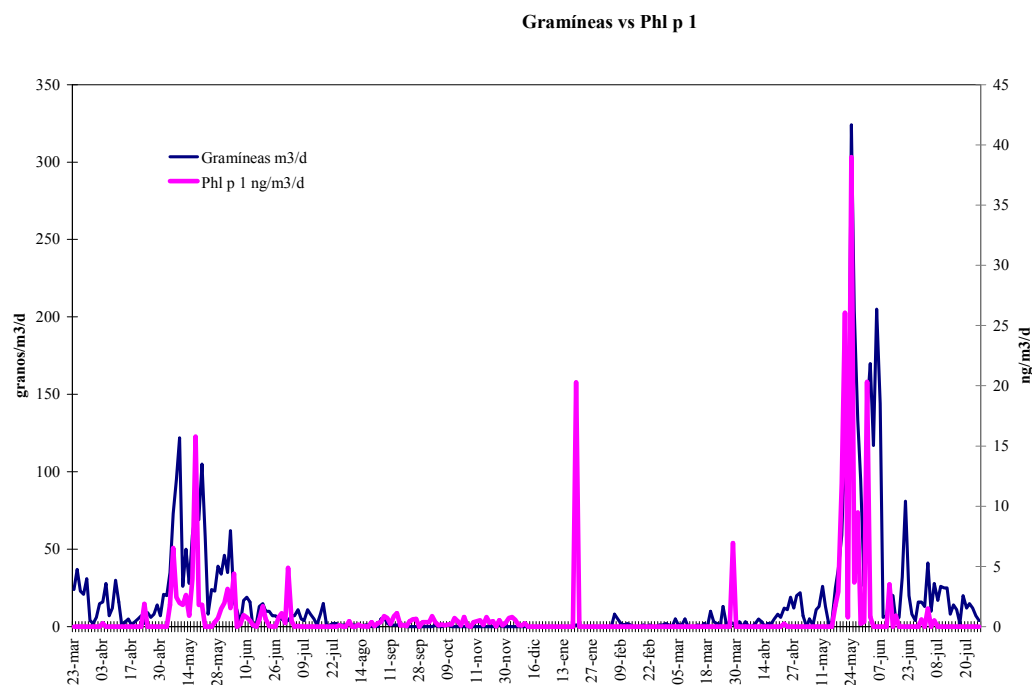


Fig. 14. Presencia del alérgeno Phl p 1 y pólenes de *Poaceae*. $r: 0,630$, $p=0,00001$.

Como observamos en las Figuras 13 y 14, para los pólenes de *Poaceae*, respecto a la presencia de Phl p1 y Phl p 5 durante el año 2009, el día pico de alérgenos se detectó el 19 de mayo (73 granos/m³/d Phl p1 15,79 ng / m³, p Phl 5: 0,24 ng / m³) y durante el año 2010 el 24 de mayo (324 granos/m³/d y Phl p1 38,9 ng/m³, p Phl 5: 1,56 ng / m³). Se detectaron más altos niveles de polen durante el año 2010, de forma significativa (del 19 de abril al 27 de julio: media de polen de 40 granos/m³/d) frente a 2009 (desde 23 de marzo al 17 de julio, con una media de polen de 19 granos/m³/d), $r: 0,33, p < 0,001$). Existen dos picos fuera del PPP de 20,28 ng/m³ y de 6,96 ng/m³ de Phl p 1 recogidos el 19/1/2010 y el 29/3/2010 respectivamente, sin objetivar que correspondiera a la polinización predominante de otro polen, ni que estuviese influido por variables meteorológicas o de contaminación.

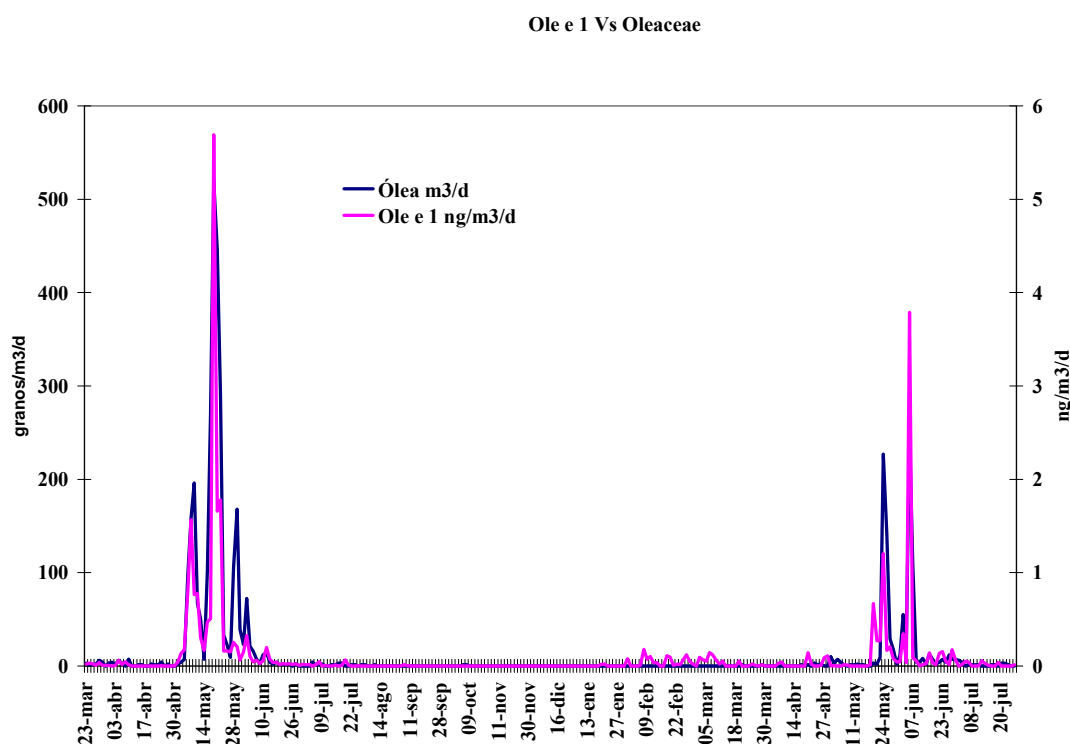


Fig. 15. Presencia del alérgeno Ole e 1 y pólenes de *Oleaceae*. $r: 0,84, p=0,00001$.

En la Fig. 15, para Ole e 1 el pico de alérgenos durante 2009 se detectó el 20 de mayo (520 granos/m³/d, Ole e 1: 5,69 ng / m³) y durante 2010 el 1 de junio (250 granos/m³/d, Ole e 1: 3,78 ng/m³). Se objetivaron niveles de pólenes de *Oleaceae* más altos en 2009 (5 de mayo al 16 junio, con una media de polen: 95 granos/m³/d) frente a 2010 (del 19 mayo al 30 de junio, con una media de polen de 19 granos/m³/d), $r: -0,14, p < 0,001$).

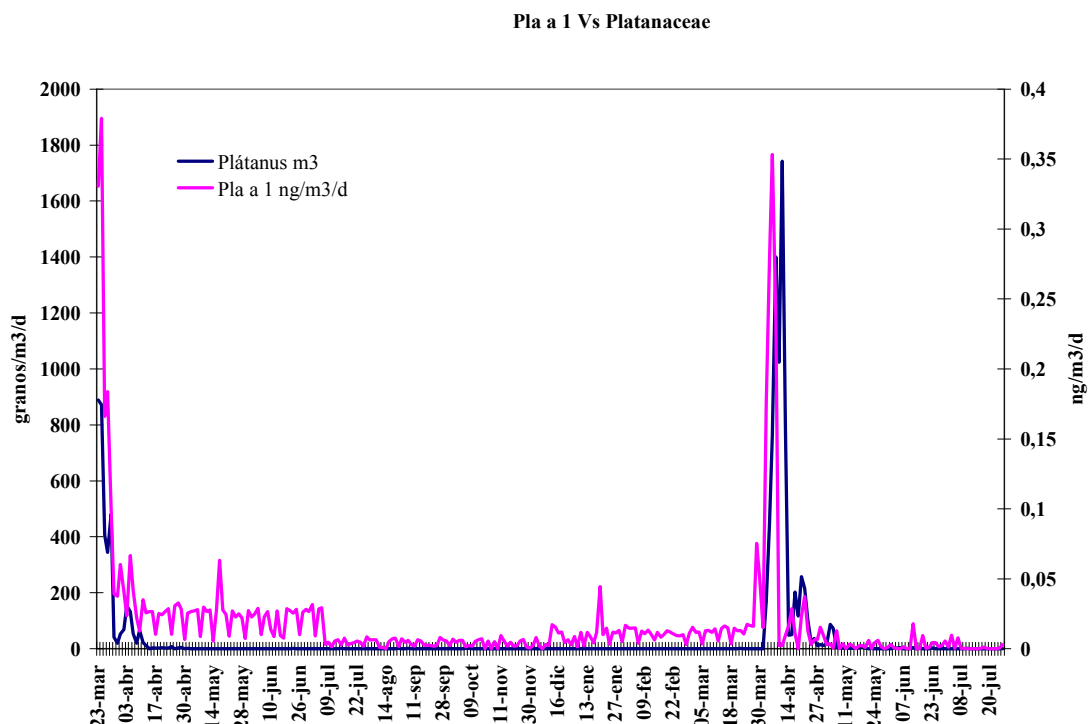


Fig. 16. Presencia del alérgeno Pla a 1 y pólenes de *Platanaceae*. $r: 0,62$, $p=0,0001$.

Observamos en la Fig. 16 que para Pla a 1, existe una buena correlación con los granos de polen durante todo el periodo de estudio de $0,62$, $p=0,0001$. Sin embargo, para el año 2010 en el que se cuantifica todo el periodo de polinización de *Platanaceae*, este coeficiente es más bajo: $r = 0,41$, $p < 0,001$. El pico de alérgenos durante 2010 se detectó el 7 de abril (762 granos/m³/d; Pla de 1: 0.35 ng/m³), habiéndose extendido la estación desde el 5 de abril al 16 mayo con una media de 230 granos/m³/d.

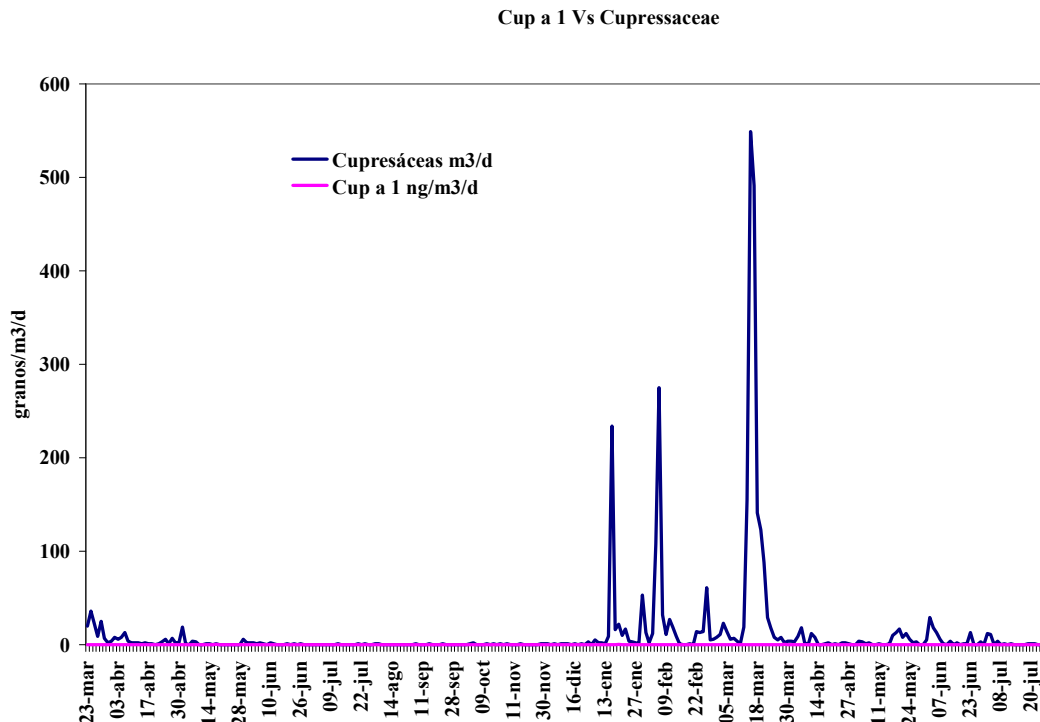


Fig. 17. Presencia del alergen Cup a 1 y pólenes de arizónica. $r: 0,017$, $p=0.43$.

En la Fig. 17 respecto a Cup a 1, los resultados se encuentran por debajo del límite de detección de la técnica, por lo que no se han podido cuantificar.

Como puede observarse en los Figs. 13, 14, 15 y 16, se producen variaciones diarias en las concentraciones de granos de polen y de aeroalérgenos, pero como puede apreciarse, la variación relativa de ambas concentraciones sigue comportamientos paralelos, como queda refrendado por la correlación positiva y significativa, para ambos años, encontrada entre ambas variables.

7.3 Datos aerobiológicos de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* en la atmósfera de Madrid en el periodo 2009-2010.

En este apartado se van a presentar los resultados de los recuentos aerobiológicos efectuados en la ciudad de Madrid desde el 23 de marzo de 2009 al 27 de Julio de 2010. En primer lugar los datos anuales de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* y los recuentos anuales totales y el régimen de lluvias; a continuación se presentarán los resultados de la evolución anual y los cálculos del Periodo Principal de Polinización (PPP).

7.3.1 Evolución de las *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* durante el periodo de estudio 2009-2010 y régimen de lluvias.

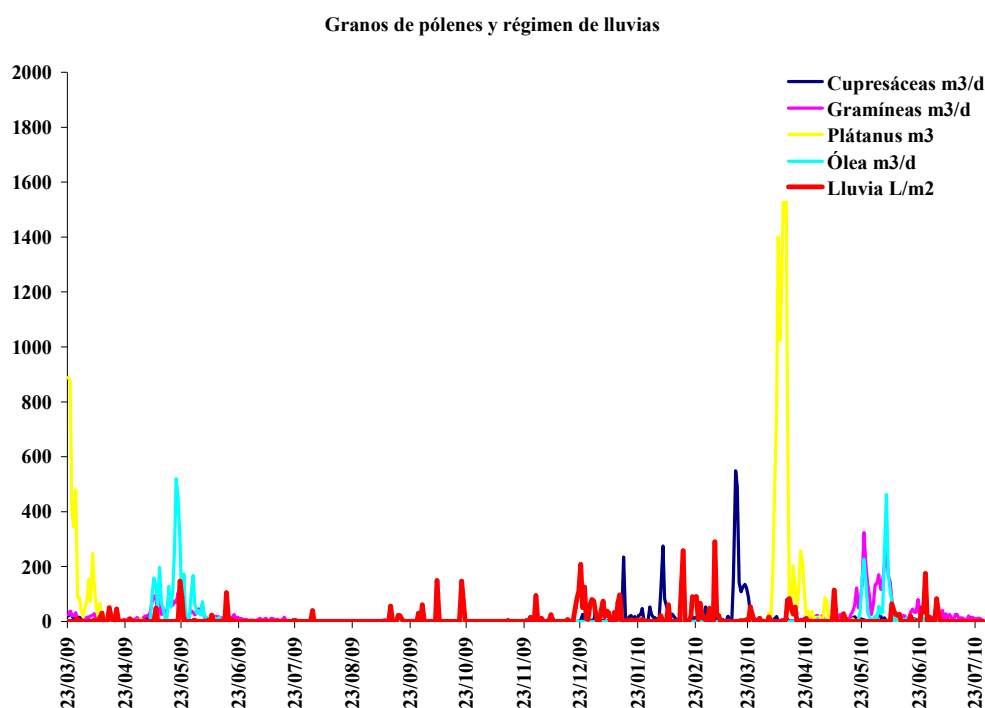


Fig. 18. Gráfico de polinización de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* en Madrid durante los años 2009 y 2010 y régimen de lluvias.

En la Fig. 18, durante el periodo de estudio se observa como inicialmente se recogen pólenes de *Platanaceae* durante marzo y abril, para continuar en mayo y junio con *Poaceae*

y *Oleaceae*. Hacia comienzos de enero aparecen granos de *Cupressaceae*, cuyo periodo de polinización se extiende hasta Marzo. El régimen de lluvias corresponde fundamentalmente a la temporada de otoño-invierno.

7.3.2 Tablas valores acumulados anuales de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* y pólenes totales de los años 2009 y 2010. Porcentaje de representación de cada uno de los taxones frente al polen total.

Evolución de los taxones durante el periodo de estudio años 2009-2010.

2009			
Taxón	Granos/m3/año	Polen total	% frente a polen total
<i>Poaceae</i>	2.556	33.544	7.62
<i>Oleaceae</i>	3.622		10.80
<i>Platanaceae</i>	7.406		22.08
<i>Cupressaceae</i>	4.702		14.02

Tabla 1. Pólenes totales y % frente a polen total año 2009.

Del polen total anual recogido en Madrid durante 2009 en el que se incluyen 44 taxones diferentes, de los pólenes a estudio, *Platanaceae* representó el mayor porcentaje, seguido de *Cupressaceae*, *Oleaceae* y *Poaceae*.

2010			
Taxón	Granos/m3/año	Polen total	%frente a polen total
<i>Poaceae</i>	4.170	36.064	11.28
<i>Oleaceae</i>	2.069		5.60
<i>Platanaceae</i>	11.008		29.78
<i>Cupressaceae</i>	4.206		11.38

Tabla 2. Pólenes totales y % frente a polen total año 2010.

Del polen total anual recogido en Madrid durante 2010 en el que se incluyen 44 taxones diferentes, de los pólenes a estudio, *Platanaceae* representó el mayor porcentaje, seguido de *Cupressaceae*, *Poaceae* y *Oleaceae*, este último sólo un 57% respecto a la cantidad

recogida en 2009, mientras que *Poaceae* duplicó su concentración respecto al año anterior (61.3%).

7.3.3 Caracterización del Periodo Principal de Polinización (PPP) ⁽¹⁾ y días pico.

Poaceae

	Fecha de inicio PPP(2)	Fecha de fin PPP (3)	Duración PPP	Fecha día Pico	Valor pico (4)
Año 2009	23/3/2009	17/7/2009	117	11/5/2009	122
Año 2010	19/4/2010	27/7/2010	100	24/5/2010	324

Tabla 3. Caracterización del Periodo Principal de Polinización (PPP) y día pico *Poaceae*.

Oleaceae

	Fecha de inicio PPP(2)	Fecha de fin PPP (3)	Duración PPP	Fecha día Pico	Valor pico (4)
Año 2009	05/5/2009	16/6/2009	43	20/5/2009	520
Año 2010	19/5/2010	30/6/2010	43	5/6/2010	463

Tabla 4. Caracterización del Periodo Principal de Polinización (PPP) y día pico *Oleaceae*.

Platanaceae

	Fecha de inicio PPP(2)	Fecha de fin PPP (3)	Duración PPP	Fecha día Pico	Valor pico (4)
Año 2009	17/3/2009	18/4/2009	34	21/3/2009	983
Año 2010	5/04/2010	16/5/2010	42	12/04/2010	1.743

Tabla 5. Caracterización del Periodo Principal de Polinización (PPP) y días pico de *Platanaceae*.

Cupressaceae

	Fecha de inicio PPP(2)	Fecha de fin PPP (3)	Duración PPP	Fecha día Pico	Valor pico (4)
Año 2009	18/1/2009	29/3/2009	71	7/3/2009	377
Año 2010	01/01/2010	28/03/2010	87	16/3/2010	549

Tabla 6. Caracterización del Periodo Principal de Polinización (PPP) y días pico de *Cupressaceae*.

PPP ₍₁₎: período en días que abarca desde el momento en que la suma de los valores medios diarios de la concentración de polen alcanza el 2,5% del total anual, hasta que su suma llegue al 97,5% del total de granos de polen, es decir, el número de días en que se recoge el 95% del total anual de granos de polen.

Fecha inicio PPP ₍₂₎: Día del año con el valor acumulado diario de granos de polen por m³, desde la aparición del primer grano de polen hasta el último en el año, que se corresponde al percentil 2,5.

Fecha finalización del PPP ₍₃₎: día del año con el valor acumulado diario de granos de polen por m³, desde la aparición del primer grano de polen hasta el último en el año, que se corresponde al percentil 97,5.

Día Pico ₍₄₎: Fecha del día dentro del PPP en el que se alcanza el valor máximo de concentración de polen en la atmósfera.

7.4 Temperatura, humedad relativa, dirección del viento y velocidad del viento en Madrid durante el período de estudio 2009-2010.

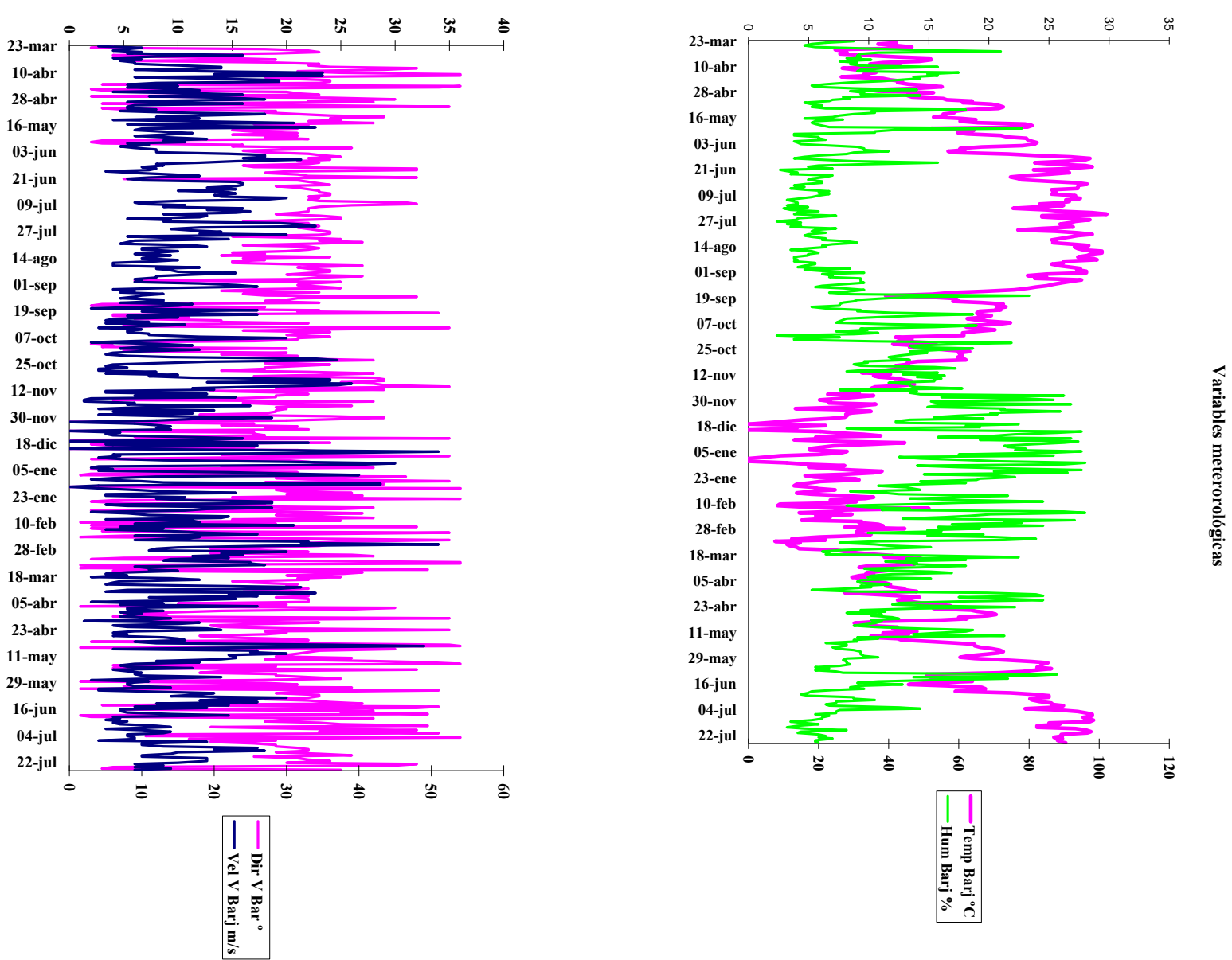


Fig. 19. Gráfico las variables meteorológicas: temperatura, humedad, dirección del viento y velocidad del viento durante el periodo de estudio 2009-2010.

En la Fig 19 se observa cómo en Madrid durante los años 2009 y 2010, se experimentaron temperaturas muy diferentes en el verano y el invierno. Durante mayo y mediados de julio, las temperaturas promedio están entre los 20 y los 32 grados Celsius. Se observa cómo hacia fines de julio y durante todo agosto, hizo mucho calor con temperaturas que llegaron a los 35 grados Celsius, acompañándose esta temporada de muy baja humedad (5-10%), comparada con la observada durante los meses de otoño-invierno (60-80%). Se observa cómo el invierno fue muy frío con temperaturas sobre los 0 grados Celsius.

7.5 Datos de contaminación en Madrid durante el periodo de estudio 2009-2010.

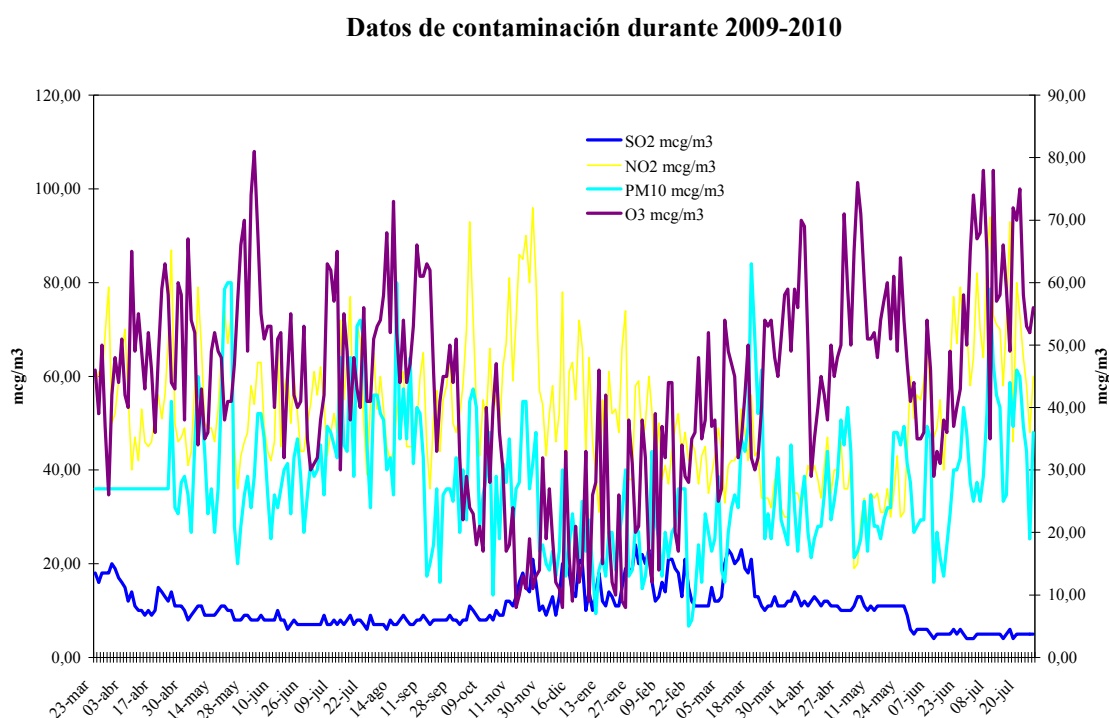


Fig. 20. Gráfico las variables de contaminación SO_2 , NO_2 , PM_{10} y O_3 durante el periodo de estudio 2009-2010.

En 2009, los valores de dióxido de Azufre (SO_2) se situaron muy por debajo del valor límite para la protección de los ecosistemas.

El dióxido de azufre se produce principalmente de la combustión del carbón, la combustión del fuel-oil y la fundición de minerales sulfurados. Su umbral de alerta es de $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durante tres horas consecutivas en un área $> 100 \text{ km}^2$. El valor límite diario para la protección de la salud humana $125 \mu\text{g}/\text{m}^3$ que no podrá superarse en más de 3 ocasiones al año. El valor límite horario para la protección de la salud humana $350 \mu\text{g}/\text{m}^3$ que no podrá superarse en más de 24 ocasiones por año.

El dióxido de nitrógeno (NO_2) es un contaminante indicador de actividades de transporte, especialmente el tráfico rodado. Es emitido directamente por los vehículos, especialmente los diesel, pero se produce en la atmósfera a partir de la reacción química de las emisiones de monóxido de nitrógeno (NO) de los vehículos. Este contaminante es el que presenta problemas actualmente en la ciudad de Madrid, incumpliendo los límites establecidos en la legislación: para 2009 estaba fijado en $42 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Además, dicho límite legal fué más estricto en 2010, siendo de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$, considerado el valor máximo compatible con una adecuada protección de la salud (Valor límite del percentil 98 de los valores horarios para la protección de la salud humana $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Valor límite anual 2009 para la protección de la salud humana $42 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Valor límite horario 2009 para la protección de la salud humana $210 \mu\text{g}/\text{m}^3$ que no podrá superarse en más de 18 ocasiones al año. Umbral de alerta $400 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durante tres horas consecutivas en un área $> 100 \text{ km}^2$). Los datos registrados indican que el valor límite legal para el periodo de estudio supero esta cifra, siendo de $49 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Durante 2010, en general los valores medios acumulados de la estación estudiada han disminuido respecto al 2009.

El material particulado es una mezcla compleja de componentes con características químicas y físicas diversas. Sus posibles efectos sobre la salud varían en función del tamaño y la composición. Durante 2009, respecto a PM_{10} , se alcanzaron cifras de $31 \mu\text{g}/\text{m}^3$ que no superaron el límite de los $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ establecido por la legislación desde 2005. Tras los resultados del 2010 ($27 \mu\text{g}/\text{m}^3$), se confirma una tendencia a la baja, detectada a partir del año 2006 para este contaminante. Sin embargo, en 10 y 13 días de 2009 y 2010 respectivamente, se superará este valor límite.

El ozono es un gas oxidante que no es emitido por ninguna fuente, sino que se forma como consecuencia de reacciones químicas en la atmósfera entre los diversos contaminantes,

como los óxidos de nitrógeno (NO), y compuestos orgánicos volátiles (COV's) en presencia de la luz solar. Durante el año 2009 no se ha registrado ninguna superación de los umbrales de información a la población o del umbral de alerta, sin embargo los valores medios anuales han experimentado una tendencia al alza, habiendo tenido en verano de 2010, superación del umbral de información a la población de $180 \mu\text{g}/\text{m}^3$ establecido por la legislación, en dos estaciones distintas a la de recogida de datos (Arturo Soria y Casa de Campo: $193 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y $185 \mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivamente).

7.6 Datos de contaminación en Madrid 2009-2010 benceno y monóxido de carbono.

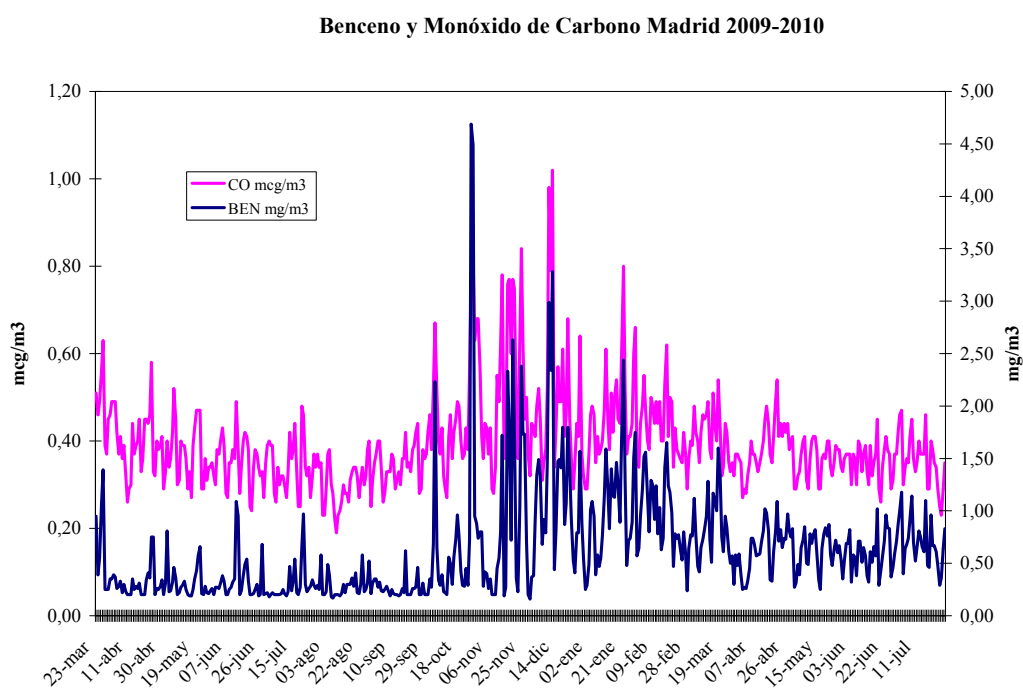


Fig. 21. Gráfico la variable de benceno y monóxido de carbono durante el periodo de estudio 2009-2010.

Como se observa en la Fig. 21, los valores máximos, son hoy en día 10 veces menores a los que se registraban hace 15 años, gracias a los avances tecnológicos en las emisiones de vehículos. Este contaminante no presenta problemas actualmente en la ciudad de Madrid, cumpliendo ampliamente los límites establecidos en la legislación: para la protección de la salud humana $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ media octohoraria máxima en un día.

El benceno es un hidrocarburo aromático que proviene principalmente de las emisiones del tráfico rodado. Es perjudicial para la salud debido a su carácter cancerígeno. Este

contaminante no presenta problemas actualmente en la ciudad de Madrid, cumpliendo ampliamente los límites establecidos en la legislación, como se observa en la Fig. 12. Valor límite anual 2009 para la protección de la salud humana $6 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

7.6 Correlaciones bivariadas de Pearson entre las variables granos de polen, alergenicos y variables meteorológicas y de contaminación.

Correlaciones de los granos de polen y las variables meteorológicas

		Cupressaceae	Poaceae	Cupressaceae	Oleaceae	Lluvia Barj	Temp Barj	Hum Barj	Dir V Barj	Vel V Barj
Cupressaceae	Correlación de Pearson	1	-,028	,003	-,034	-,030	-,153**	,048	,021	-,066
	Sig. (bilateral)		,534	,942	,454	,500	,001	,287	,645	,144
	N	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Poaceae	Correlación de Pearson	-,028	1	-,018	,667**	-,084	,227**	-,226**	,032	-,050
	Sig. (bilateral)	,534		,699	,000	,064	,000	,000	,474	,265
	N	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Platanaceae	Correlación de Pearson	,003	-,018	1	-,038	-,023	-,088	-,050	-,102*	-,087
	Sig. (bilateral)	,942	,699		,406	,612	,051	,270	,023	,054
	N	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Oleaceae	Correlación de Pearson	-,034	,667**	-,038	1	,001	,158**	-,153**	,005	,000
	Sig. (bilateral)	,454	,000	,406		,976	,000	,001	,914	,992
	N	492	492	492	492	492	492	492	492	492

Tabla 7. Correlaciones de los granos de polen y las variables meteorológicas.

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

En la Tabla 7 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson entre los diferentes granos de polen estudiados y las variables meteorológicas destacando la correlación existente con la temperatura y humedad de los pólenes de *Poaceae* y *Oleaceae* que copolinizan en mayo-junio (por ello tienen un coeficiente de correlación alto de 0,667)

coincidiendo con el aumento de temperatura que se da en primavera, así como con *Cupressaceae* en los meses de invierno, periodo en el cual poliniza.

Correlaciones de los granos de polen y las variables de contaminación

	Cupressaceae	Poaceae	Platanaceae	Oleaceae	SO ₂	CO	NO ₂	PM ₁₀	O ₃	BEN
Cupressaceae Correlación de Pearson	1	-,028	,003	-,034	,236**	,055	-,053	,134**	-,081	,144**
Sig. (bilateral)		,534	,942	,454	,000	,226	,245	,004	,072	,002
N	492	492	492	492	492	492	490	454	492	478
Poaceae Correlación de Pearson	-,028	1	-,018	,667**	-,184**	-,088	,033	,160**	,150**	-,075
Sig. (bilateral)	,534		,699	,000	,000	,052	,467	,001	,001	,103
N	492	492	492	492	492	492	490	454	492	478
Platanaceae Correlación de Pearson	,003	-,018	1	-,038	,117**	,010	-,091*	-,024	,135**	,014
Sig. (bilateral)	,942	,699		,406	,009	,817	,045	,610	,003	,759
N	492	492	492	492	492	492	490	454	492	478
Oleaceae Correlación de Pearson	-,034	,667**	-,038	1	-,087	-,019	,097*	,241**	,056	-,081
Sig. (bilateral)	,454	,000	,406		,055	,681	,032	,000	,211	,079
N	492	492	492	492	492	492	490	454	492	478

Tabla 8. Correlaciones de los granos de polen y las variables de contaminación

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

En la tabla 8 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson entre los diferentes granos de polen estudiados y la contaminación. Destaca la correlación de *Cupressaceae*, *Oleaceae* y *Poaceae* con PM₁₀, *Cupressaceae*, *Platanaceae* y *Poaceae* con SO₂, *Poaceae* y *Platanaceae* con O₃ y *Cupressaceae* con benceno.

Correlaciones de los alergenicos y las variables meteorológicas.

		g1ngm3	g5ngm3	olee1ng m3	plaa1ng m3	Lluvia Barj	Temp Barj	Hum Barj	Dir V Barj	Vel V Barj
g1ngm3	Correlación de Pearson	1	,726**	,318**	-,003	-,066	,101	-,052	,008	-,077
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,964	,266	,089	,387	,891	,196
	N	284	284	284	284	284	284	284	284	284
g5ngm3	Correlación de Pearson	,726**	1	,478**	-,053	-,073	,144*	-,115	-,031	-,100
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,377	,221	,015	,053	,603	,092
	N	284	284	284	284	284	284	284	284	284
olee1ngm3	Correlación de Pearson	,318**	,478**	1	-,003	,004	,132*	-,126*	-,044	-,037
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,963	,949	,026	,034	,461	,530
	N	284	284	284	284	284	284	284	284	284
plaa1ngm3	Correlación de Pearson	-,003	-,053	-,003	1	-,069	-,127*	-,088	-,118*	-,062
	Sig. (bilateral)	,964	,377	,963		,249	,032	,138	,047	,298
	N	284	284	284	284	284	284	284	284	284

Tabla 9. Correlaciones de los alergenicos y las variables meteorológicas.

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

En la tabla 9 se presentan los coeficientes de correlación de la cuantificación de los alergenicos estudiados y las variables meteorológicas, destacando que los alergenicos de *Poaceae* presentan un alto grado de correlación entre sí, así como con *Oleaceae* por el hecho de la co-polinización. Sólo destacable la correlación de la temperatura con la presencia de Phl p 5 y Ole e 1.

Correlaciones de los alergenicos y las variables de contaminación.

		g1ngm3	g5ngm3	olee1ngm3	plaa1ngm3	SO2	CO	NO2	PM10	O3	BEN
g1ngm3	Correlación de Pearson	1	,726**	,318**	-,003	-,054	-,059	-,079	,055	,056	-,035
	Sig. (bilateral)		,000	,000	,964	,369	,325	,186	,379	,345	,566
	N	284	284	284	284	284	284	284	258	284	277
g5ngm3	Correlación de Pearson	,726**	1	,478**	-,053	-,118*	-,101	-,076	,040	,085	-,056
	Sig. (bilateral)	,000		,000	,377	,047	,088	,204	,521	,154	,355
	N	284	284	284	284	284	284	284	258	284	277
olee1ngm3	Correlación de Pearson	,318**	,478**	1	-,003	-,051	,002	,101	,233**	-,001	-,066
	Sig. (bilateral)	,000	,000		,963	,396	,972	,088	,000	,986	,277
	N	284	284	284	284	284	284	284	258	284	277
plaa1ngm3	Correlación de Pearson	-,003	-,053	-,003	1	,211**	,034	-,056	-,044	,064	-,058
	Sig. (bilateral)	,964	,377	,963		,000	,569	,343	,485	,280	,337
	N	284	284	284	284	284	284	284	258	284	277

Tabla 10. Correlaciones de los alergenicos y las variables de contaminación.

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

* . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

En la tabla 10 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson de los alergenicos estudiados y las variables de contaminación, destacando la correlación existente entre Ole e 1 y las PM10.

Correlaciones de las variables de contaminación y las meteorológicas.

	SO2	CO	NO2	PM10	O3	Benceno	Lluvia	Temp	Humed	Dir viento	Vel viento
Correlación de Pearson SO2	1	,603**	-,088	-,235**	-,417**	,464**	,083	-,794**	,359**	-,164**	-,092
Sig. (bilateral)		,000	,141	,000	,000	,000	,161	,000	,000	,006	,124
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson CO	,603**	1	,553**	,089	-,661**	,802**	,058	-,426**	,302**	-,075	-,320**
Sig. (bilateral)	,000		,000	,136	,000	,000	,330	,000	,000	,206	,000
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson NO2	-,088	,553**	1	,473**	-,295**	,341**	-,067	,292**	-,234**	,028	-,321**
Sig. (bilateral)	,141	,000		,000	,000	,000	,263	,000	,000	,641	,000
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson PM10	-,235**	,089	,473**	1	,172**	-,020	-,137*	,570**	-,481**	,154**	-,144*
Sig. (bilateral)	,000	,136	,000		,004	,743	,021	,000	,000	,009	,015
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson O3	-,417**	-,661**	-,295**	,172**	1	-,557**	-,244**	,477**	-,596**	,062	,135*
Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	,004		,000	,000	,000	,000	,296	,023
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson Benceno	,464**	,802**	,341**	-,020	-,557**	1	,097	-,388**	,411**	-,088	-,266**
Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	,743	,000		,103	,000	,000	,142	,000
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson Lluvia	,083	,058	-,067	-,137*	-,244**	,097	1	-,213**	,464**	-,027	,139*
Sig. (bilateral)	,161	,330	,263	,021	,000	,103		,000	,000	,650	,019
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson Temp	-,794**	-,426**	,292**	,570**	,477**	-,388**	-,213**	1	-,665**	,179**	-,046
Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		,000	,002	,444
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson Humed	,359**	,302**	-,234**	-,481**	-,596**	,411**	,464**	-,665**	1	-,059	,054
Sig. (bilateral)	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		,324	,367
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson Dir viento	-,164**	-,075	,028	,154**	,062	-,088	-,027	,179**	-,059	1	,184**
Sig. (bilateral)	,006	,206	,641	,009	,296	,142	,650	,002	,324		,002
N	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492	492
Correlación de Pearson Vel viento	-,092	-,320**	-,321**	-,144*	,135*	-,266**	,139*	-,046	,054	,184**	1
Sig. (bilateral)	,124	,000	,000	,015	,023	,000	,019	,444	,367	,002	

Tabla 11. Correlaciones de las variables s alergen y las variables de contaminación.

- ** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)
- * . La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

8. DISCUSIÓN

En Madrid, el equipo de trabajo de este estudio de Tesis Doctoral que cuenta con la participación del Dr. Javier Subiza, Coordinador del Comité de Aerobiología de la Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica hasta 2010 y con el que pusimos en marcha la cuantificación de carga alérgica en la atmósfera en España en la ciudad de Madrid en el año de 1996, siendo esta la primera experiencia en España en este área, decidió en 2009-2010 volver a realizar un nuevo estudio de campo. De las diferentes alternativas posibles, nos pareció la más adecuada la cuantificación de los aeroalérgenos por un método inmunoquímico, en concreto la cuantificación mediante ELISA doble sandwich, cuya técnica también han avalado los nuevos grupos de investigación en esta área desde 2002, para que los resultados pudiesen ser comparados entre las distintas áreas geográficas de la península.

En este contexto general, nos propusimos desarrollar un trabajo de investigación en el que se estudiaran las proteínas responsables de las respuestas alérgicas, tanto en el propio grano de polen como su presencia en el aire.

Esfuerzos en este sentido se realizan por variados grupos de investigación, pudiendo destacar el proyecto Monalisa, dentro del Programa Europeo Life Environment, liderado por Thibaudon M en un estudio en el que participan 6 países europeos, entre ellos España, en la ciudad de Córdoba, que han ensayado el nuevo colector de alto volumen, “Coriolis air sampler”, que permite recoger el aerosol atmosférico para la cuantificación de esporas y pólenes. Las muestras se recogen en un medio líquido y la innovadora solución empleada permite un rápido análisis por diferentes técnicas incluyendo PCR y ensayos serológicos con el fin de cuantificar la antigenicidad/alergenidad de los pólenes y los hongos. También este dispositivo permite la identificación de granos de polen por microscopía óptica.

Al ser la fuerza impulsora de nuestro estudio la puesta en marcha de metodologías de cuantificación de aeroalérgenos que permitan complementar los recuentos tradicionales de granos de polen o incluso llegar a sustituirlos, nos pareció que de entre las diferentes opciones de muestreo posible, las máximas ventajas las tendría aquel método que recogiera, en principio, un volumen de aire similar al de la metodología más extendida en aerobiología y utilizada por nuestro grupo, el método de Hirst. Además, en la selección del método nos pareció fundamental conseguir una única muestra diaria, representativa de la carga alérgica total, mejor que un fraccionamiento por tamaño, que complicaba tanto el muestreo como la posterior cuantificación. Por ello, tras estudiar los aparatos disponibles en el mercado nos decantamos por el ciclón Burkard, al que nos hemos referido en materiales y métodos, para el cual se dispone de datos de eficiencia del fabricante (100% para partículas mayores de 1,06 micras). Otra ventaja fundamental de este equipo es que recoge la muestra en fase sólida, en un tubo Eppendorf, con lo cual se facilita el manejo posterior de la misma.

Además, considerábamos importante repetir la experiencia en Madrid, con una metodología puesta a punto con el mismo captador utilizando un protocolo común de extracción e inmunodetección. Como hemos referido en materiales y métodos, las proteínas solubles son eluidas de la muestra según modificación de Moreno-Grau et al, 2006 (73) del método propuesto por Takahashi et al en 2001 (71) y se realiza la cuantificación por una técnica enzimo inmuno analítica en dos pasos (74,75), utilizando como patrones eluidos obtenidos a partir de material de referencia.

Los resultados obtenidos en este estudio de Tesis Doctoral con la metodología planteada, muestra un excelente grado de ajuste con los datos recogidos de concentraciones de los tipos polínicos estudiados por el método tradicional de identificación morfológica y recuento, obteniendo coeficientes de determinación por encima de 0,90 entre los valores del alérgeno y los recuentos polínicos, pudiendo asegurar que la metodología propuesta en este trabajo de cuantificación de aeroalérgenos se ha mostrado eficaz para la valoración de la carga alérgica de Phl p1, Phl p 5, Ole e 1 y Pla a 1 en el bioaerosol y los recuentos polínicos, con una excelente correlación con los niveles de pólenes presentes en la atmósfera para el mismo periodo de tiempo cuantificado. El método de toma de muestra permite recoger tanto los pólenes completos como fragmentos o partes.

Con este trabajo hemos contribuido a completar el estudio con nuevos tipos polínicos en Madrid, habiendo realizado la serie temporal más extensa hasta la fecha, ya que el periodo de recolección de las muestras se extendió mucho más allá del periodo álgido de polinización, hasta año y medio, tiempo que nos permite observar si efectivamente, fuera de este periodo, se objetivan incrementos de la actividad alergénica de los tipos polínicos estudiados, que pudieran explicar la aparición de síntomas fuera del periodo de polinización.

8.1 Puesta a punto del ELISA doble sándwich y hallazgos comparativos con otros estudios que utilizaron la misma técnica.

Como comentamos previamente, esta técnica ha sido puesta a punto para los diferentes alergenos estudiados por MC Arilla del Departamento de I+D+i de Laboratorios Bial Aristegui. El primero de ellos fue con Ole e 1 (74) habiendo encontrado una alta reproductibilidad y sensibilidad, con un límite de detección de 0,5 ng/ml, seguido de Dac g 1 (76) con un límite de detección de 31,25 ng/ml. Respecto a Pla a 1 (77), también se encontró una alta sensibilidad con un límite de detección de 0,5 ng/ml y altamente específico. Para Cup a 1 (78) el estudio mostró una alta sensibilidad con un límite de detección de 8.7 ng/ml obteniendo un ensayo altamente reproducible con coeficientes de correlación intraensayo e interensayo menor del 10%. Todos ellos mostraron una alta correlación con el contenido de estos alergenos medido por densitometría en cada uno de estos estudios.

También en la puesta a punto de estos ensayos, las rectas obtenidas en la cuantificación de estos alergenos fueron paralelas a la curva obtenida con el alergeno patrón, lo que confirma que no hubo alteración del alergeno durante el proceso de extracción de las muestras estudiadas.

El ELISA doble sandwich se basa en el uso de uno o varios anticuerpos monoclonales para la captura del alergeno, con lo que se evitan los posibles cambios conformacionales que pudieran ocurrir si el alergeno se adsorbiera directamente a la fase sólida. En este trabajo

se ha aplicado dos anticuerpos monoclonales para la captura de la proteína y uno marcado con biotina para la detección.

Respecto a los grupos 1 y 5 de gramíneas que son los principales grupos alergénicos de polen de *Poaceae* ya que se reparten el 80% de la potencia alérgica de los mismos y se caracterizan por presentar similares parámetros bioquímicos tales como peso molecular y punto isoelectrico, por lo que resultan difíciles de purificar por cromatografía de intercambio iónico o tamizado molecular. Tampoco otros métodos como la fase reversa resultan de utilidad, puesto que pueden alterar la conformación molecular del alérgeno, lo que influiría en su interacción con los anticuerpos del ensayo.

Podemos decir que la técnica de inmunodetección utilizada para la cuantificación de alérgenos en la atmósfera es un método sensible, específico y reproducible.

Respecto a los estudios realizados por Moreno Grau y Suárez Cervera con esta misma metodología (73), respecto a Ole e 1, Par j 1 y Par j 2 encontraron que día a día las variaciones observadas de ambos pólenes y la presencia de aeroalérgenos en el bioaerosol estaban estrechamente relacionadas con un coeficiente de correlación $r=0,892$, $p<0,001$ y $r=0,734$, $p<0,001$ respectivamente, habiendo observado que con *Urticaceae* (Par j 1 y Par j 2) se encuentran diferencias en las diferentes áreas bioclimáticas estudiadas, Cartagena y Orense, encontrando que en Cartagena, a pesar de las menores concentraciones de pólenes de *Urticaceae*, se registró una concentración de alérgenos más alta que en Orense, con una menor correlación : $r=0,46$, $p<0,001$. En este estudio se utilizó microscopía electrónica para estudiar la localización de los alérgenos, habiéndose encontrado en los orbículos, membrana del tapete y remanentes del tejido del tapete. Más recientemente, este equipo incorporó a su análisis la ciudad de León (79), siendo en ésta y en Orense los pólenes de *Poaceae* la principal causa de polinosis, mientras que en Orense y Cartagena lo son *Urticaceae* y *Platanaceae*. Se encontró que en Orense el recuento de pólenes y las concentraciones de alérgeno coincidieron para los tres tipos polínicos, estando estos datos asociados con los factores meteorológicos con el recuento de pólenes. En Cartagena (para *Platanaceae* y *Urticaceae*) y en León (para *Poaceae*), se encontraron bajas correlaciones entre el recuento de pólenes y las concentraciones de alérgenos, posiblemente asociadas con las condiciones bioclimáticas específicas: las temperaturas templadas, la alta humedad

relativa y la lluvia abundante tienen más influencia en la dispersión del polen que sobre la liberación de alérgenos (80). En Orense, las condiciones de humedad continua y uniforme puede producir la liberación de Pla a 1 al mismo tiempo que se que los granos de polen en el bioaerosol. Por el contrario, en Cartagena, la habitual falta de lluvia en combinación con periodos irregulares de lluvia (79), pueden explicar la discordancia observada entre los recuentos de pólenes de *Platanaceae* y las concentraciones de Pla a 1. Se encontraron altas concentraciones en Cartagena y León comparado con Orense pudiendo estar relacionado con la existencia con los niveles de contaminantes atmosféricos que pueden inducir una mayor expresión de proteínas relacionadas con la patogénesis en las plantas de ciudades muy contaminadas.

Sin embargo, Fernández González D (81) cuantificando Pla a 1 con el mismo Burkard Cyclone en León, con el mismo método de inmunodetección, encontraron que la presencia atmosférica de Pla a 1 parece ser independiente de los recuentos de granos de polen de *Platanaceae* durante el mismo periodo de tiempo, aunque durante el periodo principal de polinización las curvas de polen y alérgeno presentaron un comportamiento similar. Tres semanas antes y tres semanas después de este periodo, el comportamiento fue diferente, ocurriendo el pico de alérgeno tras el periodo máximo de emisión de polen tanto en 2008 como en 2009.

En este estudio de Tesis Doctoral, dadas las características del clima de Madrid, caracterizado por escasa lluvia, veranos calurosos e inviernos fríos y secos, a la luz de los coeficientes de correlación encontrados, podemos afirmar que en esta área geográfica la fuente principal de alérgenos la constituye el propio grano de polen y que la temperatura favorece la liberación de granos de polen. Así, los coeficientes de correlación de Pearson entre los diferentes granos de polen estudiados y las variables meteorológicas, destaca la correlación existente con la temperatura y humedad con los pólenes de *Poaceae* y *Oleaceae* que co-polinizan en mayo-junio coincidiendo con el aumento de temperatura que se da en primavera, así como con *Cupressaceae* en los meses de invierno, periodo en el cual poliniza. En cuanto a los alérgenos, sólo destacable la correlación de la temperatura con la presencia de Phl p 5 y Ole e 1, factor meteorológico que también favorece la liberación de alérgenos (65).

Respecto a las variables de contaminación, en este estudio hemos objetivado una correlación de *Cupressaceae*, *Oleaceae* y *Poaceae* con PM10, *Cupressaceae*, *Platanaceae* y *Poaceae* con SO₂, *Poaceae* y *Platanaceae* con O₃ y *Cupressaceae* con benceno. Respecto a los alérgenos estudiados y estas variables, destaca la correlación existente entre Ole e 1 y las PM10.

8.2 Variaciones anuales en las concentraciones de pólenes.

Hemos observado en este estudio con las *Poaceae* y *Oleaceae* que en nuestro medio de Madrid, existen grandes variaciones en las concentraciones atmosféricas que se suceden de año en año. Así por ejemplo, cuando sumamos las concentraciones atmosféricas medias diarias de *Poaceae* de Abril, Mayo, Junio y Julio de 2.009, observamos que el total fue de 2.152 *Poaceae* totales estacionales (GTE). Tan sólo un año después, en 2010, las GTE fueron de 4.025, es decir, un 46,53 % más alto que el año anterior. Con los otros taxones, ocurre también una gran variabilidad.

En el intento de buscar la existencia de múltiples correlaciones entre las GTE y factores meteorológicos tanto estacionales como pre-estacionales, se ha podido comprobar que el determinante principal de estas variaciones anuales corresponde a la pluviosidad y humedad media del aire de los meses de Octubre, Noviembre, Diciembre y Enero previos a la estación (Abril-Julio). Por tanto estas lluvias de otoño-invierno conocidas como “sementera o germinación”, parecen ser el más importante condicionante en la producción de GTE. Estas lluvias de otoño son esenciales para que germinen las semillas de las *Poaceae* anuales (vida de la planta de un año; ej., el *Trisetum Paniceum*) y permitan que éstas puedan posteriormente crecer (Marzo-Abril) y florecer (Mayo-Junio) con la subsiguiente emisión de pólenes. Por el contrario, las *Poaceae* perennes parecen ser menos susceptibles y por lo tanto los descensos o aumentos de año en año en las GTE suelen ser principalmente a costa de las *Poaceae* pequeñas, lo cual a su vez es probablemente debido al descenso o incremento de la pluviosidad otoñal-invernal respectivamente (67). La correlación es tan estrecha, que mediante la combinación adecuada de estos datos

meteorológicos pre-estacionales a través de una fórmula de regresión multilíneal podemos predecir con un aceptable grado de certeza a primeros de abril las GTE (82).

Es necesario conocer la evolución en el tiempo para interpretar adecuadamente los resultados obtenidos en el periodo de estudio ya que, es bien conocido que las concentraciones de polen atmosférico presentan gran variabilidad a lo largo del tiempo, en horas, días, estaciones y años, siendo necesario disponer de varios años de datos para calcular los valores medios de polen (índices polínicos atmosféricos) y evidenciar los cambios en sus tendencias.

8.3 Comportamiento aerobiológico de los granos de pólenes de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* y sus respectivos alérgenos, durante el periodo de estudio 2009-2010.

Ante todas las evidencias expuestas, se puede considerar al grano de polen el transportador primario de las proteínas alérgicas, ya que la importancia cuantitativa del resto de las aportaciones debe ser pequeña, o producirse de modo puntual, ante situaciones concretas, pero a la luz de todo lo dicho, hemos considerado una buena aproximación al problema desde la aerobiología la cuantificación de la carga alérgica presente en el bioaerosol para cada alérgeno principal de los tipos polínicos reconocidos en una determinada área geográfica, con métodos simples y fiables que permitan entrar dentro del rango de sensibilidad de la técnica de cuantificación propuesta, obteniendo datos que tengan valor para los estudios epidemiológicos.

Son ya bastantes los diversos esfuerzos realizados en este sentido, tanto en lo relativo a la toma de muestra como en los métodos de cuantificación. De modo resumido a lo que se ha expuesto en la introducción, podemos indicar que se han utilizado captadores tanto de alto volumen (22), como de bajo volumen (26), con fraccionamiento por tamaño de partícula (83) y con captadores tipo ciclónico (30).

En cuanto a las metodologías para la cuantificación de alérgenos, en primer lugar hay que preparar la muestra para la cuantificación, bien mediante la elución de los alérgenos (22), o

mediante la transferencia a membrana, generalmente de nitrocelulosa (84). Para la cuantificación de los aeroalérgenos se han utilizado métodos inmunoanalíticos, bien mediante la visualización y cuantificación directa en filtros (85), cuantificación por RAST inhibición (86), revelado de las proteínas tras la transferencia mediante inmunobloting o ELISA (87).

En general, podemos afirmar que en las muestras cuando se produce un incremento en los recuentos de granos de *Poaceae*, *Oleaceae* y *Platanaceae*, se produce también un incremento en las concentraciones de los alergenicos. Solo para el año 2010, el comportamiento de los alergenicos de *Platanaceae* respecto al su respectivo recuento de pólenes difiere del encontrado en 2009. Su comportamiento para el año 2009, así como el de *Poaceae* y *Oleaceae* en 2009 y 2010 presentan unos coeficientes de correlación muy altos con su correspondiente grano de polen, atendiendo al PPP de cada uno de ellos así como para el año completo (Phl p 1, r: 0,63; Phl p 5, 0,70, Ole e 1, r: 0,84, Pla a 1, r: 0,62), estadísticamente significativos $p=0,00001$.

Así, para 2009 y 2010 se han encontrado buenos paralelismos entre el comportamiento de los recuentos de los granos de polen y los de aeroalérgeno en las 284 muestras obtenidas, excepto para *Platanaceae* en 2010 con un coeficiente de correlación más bajo pero significativo (Pla a 1, r: 0,41, $p=0,0001$), sin encontrar ninguna explicación desde el punto de vista de posibles influencias de las variables meteorológicas ni de contaminación.

Respecto al desajuste objetivado en la cuantificación de Pla a 1 (Fig. 16) para el año 2010, donde la presencia de aeroalergenicos se adelanta a la del respectivo polen, encontrando el valor máximo de los recuentos polínicos en la muestra posterior al máximo encontrado en el aeroalérgeno, no se puede señalar que la presencia de un fenómeno meteorológico haya influido.

La cantidad de alérgeno extraíble por unidad de peso del material de partida varía enormemente en función de su origen, hecho que dificulta la estandarización de los extractos en unidades de masa y que afecta tanto a la reproductibilidad de las pruebas diagnósticas como al tratamiento de las enfermedades alérgicas (65). Este mismo problema se tiene al realizar las extracciones para la cuantificación de los aeroalérgenos (65). Se ha

comprobado que las plantas sometidas a diferentes condiciones pueden producir mayor o menor cantidad de proteínas alergénicas (65).

Este sería un aspecto a considerar, si a lo largo de la estación polínica las diferentes procedencias de los granos de polen pueden dar lugar a variaciones en la capacidad productora de alérgenos y diferentes niveles. También encontramos que los valores absolutos de la cuantificación de los aeroalérgenos varían entre los años estudiados como lo hicieron los granos de polen. Así para 2009, no se superan los 15,79 ng/m³ de Phl p1, mientras que para 2010, se superan estos valores, alcanzando los 38,9 ng/m³.

Otro aspecto a destacar está relacionado con el muestreo. Mientras que la metodología Hirst nos permite tener datos diarios de las concentraciones de los diferentes tipos polínicos, y los días comprenden desde las 0 horas a las 24, es decir, son días naturales completos, en el método utilizado, el captador ciclónico Burkard, el muestreo es manual, lo que obliga a acudir al captador con carácter diario, lo que en ningún caso se realiza a las 24 horas del día, y, en nuestro caso, nos ha obligado a acumular las muestras en los días festivos y fines de semana, por lo que las fechas de muestreo no coinciden completamente con los días naturales, sólo en el caso de los aeroalérgenos.

El análisis global de los datos aportados en esta memoria, en la que hemos comprobado que las concentraciones de granos de polen de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanacea* y *Cupressaceae*, pólenes de mayor relevancia alergológica en Madrid, causantes de la mayoría de los casos de rinoconjuntivitis alérgica según el informe alergológica (12), respecto al estudio multicéntrico de 2003 (12), las concentraciones de pólenes respecto al polen total de estos taxones durante los años 2009 y 2010 se corresponden con los datos de este informe, que en 2009 fueron de 7,62%, 10,8%, 22,8% y 44,02% y en 2010 de 11,28%, 5,6%, 29,78% y 11,38%, respectivamente, observándose las mayores variaciones interanuales para *Poaceae* y *Oleaceae*. Estos datos son muy similares a regiones próximas a Madrid, como lo es Toledo (12).

Madrid se caracteriza por una alta polisensibilización en torno al 40% siendo un factor esencial en las manifestaciones clínicas en nuestra área y que la homología existente entre los distintos alérgenos (67), conducen a que la carga alergénica total sea importante, aún

cuando los valores cuantitativos de cada uno de los taxones presentes no alcancen la importancia de los referidos en otros lugares (12).

La contaminación ocasionada por las industrias y el tráfico rodado es uno de los factores que puede estar contribuyendo al incremento de la patología alérgica, pudiendo la propia contaminación incrementar la producción de alérgenos, por lo que nos podríamos encontrar con diferentes capacidades de respuesta de unas zonas a otras en cuanto a la alergenicidad de los pólenes. Por todo ello, resulta esencial determinar para cada área geográfica concreta la evolución de las concentraciones de los taxones más representativos desde el punto de vista tanto de su cantidad como de sus efectos para, cuando se han obtenido series temporales suficientemente extensas, analizar desde un punto de vista estadístico su comportamiento y poder definir tanto su PPP, como los valores umbrales a considerar en la información aerobiológica suministrada, para que sea realmente de utilidad para las personas afectadas, y los valores incorporados en la información polínica se corresponda con la sintomatología real que el paciente experimenta, complementando la información relativa a los niveles polínicos con la evaluación de los aeroalérgenos presentes en el bioaerosol.

Sin duda, la climatología local tiene una clara influencia en los índices polínicos atmosféricos, siendo una de las causas de la variabilidad interanual de los diferentes taxones. En 2009 como consecuencia de las lluvias de los meses de otoño/invierno, se esperaban desde el punto de vista predictivo, altas concentraciones de pólenes de gramíneas, pero los cambios inesperados en el clima, convirtieron la esperada primavera intensa de 2009 en una estación leve. Para 2010 como consecuencia de las lluvias registradas en diciembre, enero y febrero, se preveía una polinización intensa, estimándose que las concentraciones acumuladas de polen de gramíneas, que aparecían de abril a julio superarían los 5.100 granos/m³ de aire, frente a los 2.800 registrados en 2009.

En general en España la floración de *Olea* se extiende de abril a junio, adelantándose un mes en las provincias más meridionales (65) aunque el periodo de máxima concentración polínica suele ser breve presentándose los niveles máximos en la segunda quincena del mes de mayo, favorecido por el incremento de la temperatura al final de la primavera (65).

Aunque las variaciones interanuales de Olea dependen fundamentalmente del fenómeno de alternancia de cultivos, estudios aerobiológicos realizados en Toledo y Ciudad Real ponen de manifiesto cómo la lluvia estacional o la inestabilidad atmosférica (vientos/calmas) son también determinantes en las cantidades de polen recolectado (65).

Las zonas oliveras de nuestro país (Jaén, Sevilla, Toledo, Ciudad Real) muestran también una moderada alternancia en la concentración de pólenes de olivo, relacionada igualmente con temperatura y pluviosidad estacionales (65). Otro aspecto que cabe resaltar del polen de olivo es su alta capacidad aerovagante, llegándose a recolectar sus pólenes a más de 100 km de distancia, y en cantidades reactivas (alcanzando hasta los 650 granos/m³ de aire), como se ha comprobado durante varias temporadas en Toledo o Ciudad Real, y procedente de las vecinas zonas oliveras de Jaén y Córdoba. Este hecho se asocia a los días de elevada humedad atmosférica que, al disminuir la densidad de las partículas polínicas, podría favorecer su desplazamiento (65).

Feo Brito observó un comportamiento en la actividad alérgica de las gramíneas en la atmósfera de Ciudad Real muy similar a la de Madrid, mientras que, por el contrario, los antígenos de Olea europaea mostraron una distribución más recortada y limitada a su temporada polínica (88, 89).

La polinización del plátano de sombra es explosiva al inicio de la primavera, pudiendo llegar a picos como el que se produjo en Madrid el 14 de marzo de 1997 con 4.265 granos/m³ de aire (65). Además de los altos niveles que se contabilizan en primavera, se detectan también niveles significativos a finales de octubre y principios de noviembre a pesar de no existir polinización. Esto sucede porque al producirse la caída de las hojas en otoño, estas arrastran y desprenden granos que se habían quedado en las hojas durante la época de polinización (65).

Respecto a Cup a 1, los resultados de la concentración de alérgeno se encuentran por debajo del límite de detección de la técnica, por lo que no se han podido cuantificar, pudiéndose tratar de dificultades en la extracción de las proteínas. Respecto al periodo de polinización 2009-2010, se extendió desde el 24 de diciembre al 27 de marzo, con 37 granos/m³/d de media diaria.

De forma general el periodo de polinización principal *Cupressaceae* se registra generalmente durante el primer trimestre del año en casi todas las ciudades españolas, excepto en Toledo, que tiene cifras elevadas en el cuarto trimestre, posiblemente por el género *Juniperus* (65).

En Madrid la rinoconjuntivitis estacional puede producir síntomas a lo largo de todo el año dadas por la alta frecuencia con que los pacientes alérgicos desarrollan alergia a otros tipos polínicos y otros alérgenos presentes en diferentes épocas del año (65), lo que hace que los síntomas se alarguen en el tiempo y sufran asma alérgico un 20% de los mismos (12).

En ocasiones, y para algunos tipos polínicos en particular, han de establecerse categorías y umbrales de concentración polínica a nivel local o regional teniendo en cuenta los numerosos actores que condicionan su presencia: abundancia de la especie en una zona concreta, presencia de otras especies con las que puede establecer relación de reactividad cruzada, presencia de contaminantes atmosféricos, condiciones meteorológicas particulares, etc., y que intervienen en la aparición de síntomas en las personas afectadas de polinosis. Para ello usan la base de datos aerobiológica histórica de cada tipo polínico y se calculan los percentiles 90, 95 y 99 para establecer los niveles bajos, medios, altos y muy altos.

Referente a posibles discordancias con el establecimiento de las diferentes categorías polínicas, no hay que olvidar que se intenta homogeneizar la información aerobiológica en el territorio nacional, pero a nivel regional o local esta información debe adecuarse a la realidad clínica existente en dicho territorio. Los efectos sobre la salud dependerán, además de los niveles polínicos, de la susceptibilidad individual de cada persona y de la actuación, combinada o no de otros factores individuales y ambientales.

Es evidente que los síntomas clínicos de los pacientes son el reflejo de la exposición a numerosos alérgenos y que el nivel umbral de respuesta se ve afectado por la interacción entre ellos, lo que explica la dificultad de establecer precisos umbrales de reactivación de los pacientes polisensibilizados (habitual en Madrid) cuando se estudia un tipo polínico que comparte su PPP con otros pólenes alérgicos.

La discordancia entre estos valores y la clínica se produce, por que solo se consideran los índices polínicos atmosféricos de forma absoluta, pero el grano de polen, es una partícula biológica cuya presencia en la atmósfera depende de aspectos fundamentales como la fenología de la floración, la capacidad individual de cada planta para liberar el polen a la atmósfera y las variables meteorológicas (temperatura, humedad, radiación, vientos dominantes y pluviosidad) que afectan a su transporte y dispersión. En el tratamiento estadístico no se contemplan otros aspectos relevantes como la sensibilización local de la población a cada taxón, su capacidad alergénica individual, predominio local y estacional del taxón, localización rural o urbana, contaminación atmosférica presente y tasa de prevalencia de enfermedades respiratorias en dicha área geográfica.

Es evidente que los síntomas son el reflejo de la exposición a numerosos alergenos y que el umbral de respuesta se ve afectado por la interacción entre ellos, lo que explica la dificultad de establecer precisos umbrales de reactivación. Aun así, se ha establecido qué concentraciones de *Poaceae* entre 10 a 50 granos/m³ de aire (90, 91, 92) y de *Oleaceae* entre 153-400 granos/m³ son capaces de reactivar a la mayoría de los pacientes clínicamente sensibilizados (93, 94).

8.4 Mecanismos de liberación de partículas micrónicas asociadas a pólenes.

Con relación a estas fuentes de alergenos, D'Amato G (95) y Vinckier S (96) coinciden en la contribución de pequeñas partículas portadoras de alergenos denominadas cuerpos de Übish. Su función se desconoce pero su presencia es abundante, poseen un diámetro aerodinámico que posibilita que penetren en la vía aérea inferior (0,5-1,5 µm) y se ha demostrado que son portadoras de alergenos. Un hecho interesante es que las angioespermas causantes de rinoconjuntivitis alérgica están caracterizadas por la presencia de un *tapetum* secretor, característica esencial para la producción de estas partículas. Estas partículas se han encontrado en las siguientes familias de plantas alergénicas: *Poaceae*, *Betulaceae*, *Chenopodiaceae*, *Fagaceae*, *Polygonaceae* y *Urticaceae*, pero no en *Asteraceae* u *Oleaceae* (96).

Respecto a la formación de aerosoles biológicos, Taylor PE (97), realizó la primera observación directa de la formación de aerosoles de alergenos de pólenes de forma controlada en laboratorio dentro de una cámara de plexiglas donde se controlaba la humedad, temperatura y turbulencia. A este habitáculo se acopló un captador de partículas, con el fin de replicar el mecanismo natural de los aerosoles cargados de alergenos de pólenes.

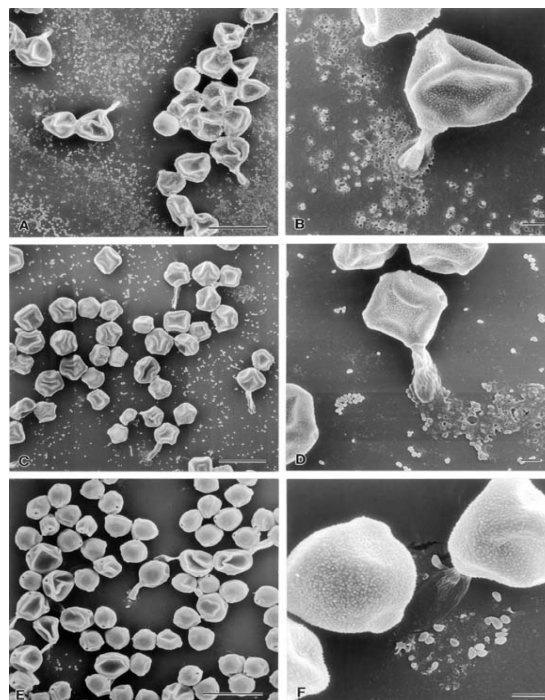
Para determinar dónde y bajo qué condiciones ocurría la liberación de estas partículas respirables, observaron la floración de dos Poaceae. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Aproximadamente el 72% de los pólenes frescos recolectados en contacto con el agua, se rompieron dentro de los primeros 5 minutos. Se observó que el humedecimiento tenue como podría ocurrir durante la formación del rocío o por sedimentación de gotas de niebla, produce también la ruptura. El tiempo requerido para la ruptura se incrementaba con la edad del polen, y con el paso del tiempo, la fracción de granos que rompe, decrecía. Verificaron que los pólenes comerciales guardados por más de 1 año a 4°C tienen un porcentaje de ruptura menor del 1% y también que los granos expuestos a soluciones isotónicas no se rompen.

La segunda parte de esta investigación consistió en la humidificación en cámara y secamiento posterior de las flores. Para ello se expusieron las flores en la cámara a una humedad relativa de 53-67% por un periodo de 2-3 horas a 27°C de temperatura. Se observó que las anteras se levantan y se despliegan. En los siguientes dos días no se apreciaron cambios, salvo que se seguían generando anteras y la mayoría de los pólenes permanecen en las anteras. La muestra de aire que se estudió no mostraba partículas respirables libres, aún tras sacudir a la planta o soplarlas. Si se observó liberación de pólenes tras someter a las anteras secas a condiciones de turbulencia. Se observó que los restos citoplasmáticos de polen forman un aerosol con un tamaño de partícula menor y en mayor cantidad que los gránulos de almidón. Por ello, su deposición en la vía aérea inferior podría ser mayor a lo que se ha especulado previamente. La observación de este equipo de investigadores sobre la liberación de componentes subcelulares de polen tras un ciclo de humidificación, mojado y secamiento de las inflorescencias, muestran como la lluvia ligera, rocío, niebla y regado del césped pueden romper los pólenes dentro de las anteras.

Tras el secado y con turbulencia se liberan partículas cargadas de alergen de tamaño respirable como un aerosol.

Estos hallazgos apoyan las investigaciones de Suphlioglu C (31) que sugirió que en condiciones de humedad o durante las tormentas, los granos de polen pueden romperse por shock osmótico y pueden liberar parte de su contenido, incluyendo los gránulos de almidón portadores de alergen, lo que dio en su día la explicación de las epidemias de asma bronquial asociadas a tormentas en Londres y Melbourne (32, 33, 34, 35).

Posteriormente, Grote M (98), describió otro mecanismo de liberación de alergen en partículas micrónicas conocido como germinación abortiva del polen, que lo verificó en el abedul, aliso y avellana en condiciones controladas bajo la lluvia (Fig. 22). Observó que se produce un tubo polínico y constató que los alergen en partículas micrónicas son transportados a través de este tubo durante la germinación, y posteriormente se liberan tras su ruptura.



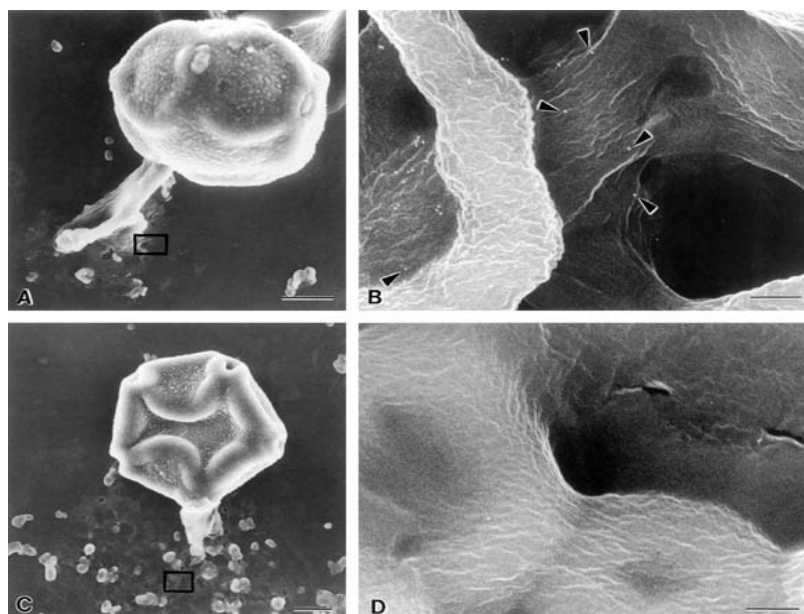


Fig. 22. Tomado de Grote M. J Allergy Clin Immunol. 2003 May; 111(5): 1017-23

Diversos factores genéticos de las plantas y árboles pueden tener un efecto en la alergenidad del polen. Por ejemplo, el nivel medio de alérgenos presentes en el polen de abedul puede ser heredado y podríamos encontrar diferencias regionales en la alergenidad polínica de grupos de árboles de una misma especie (99).

8.5 Comparación con metodología de otros estudios

8.5.1 Captadores

En la actualidad se dispone de numerosos dispositivos para la captación de bioaerosoles de medio ambiente tanto de exterior e interior (100, 101, 102, 103, 104, 105). Cada dispositivo tiene sus ventajas y desventajas, dependiendo del entorno en el cual se utiliza y el tipo de muestra que se recoge. Se ha investigado ampliamente sobre estos dispositivos y se han realizado diferentes estudios comparativos (100, 101, 102, 103, 104, 105).

Entre los dispositivos más comúnmente utilizados para la recolección de partículas encontramos los impactadores de rotación, trampas de succión, impactadores líquidos y colectores ciclónicos secos (106, 107, 108, 109).

Los dos primeros tipos de recolectores impactan las partículas en superficies adherentes y se valoran por microscopía de luz. Sus ventajas residen en que su lectura es volumétrica, precisan poco mantenimiento, y la trampa de succión puede guardarse como muestra permanente de archivo. Sus desventajas consisten en que la identificación de partículas precisa de una intensa labor personal y que en algunos casos, el material obtenido no puede identificarse, perdiéndose de esta manera posible material con relevancia clínica (107).

Los impactadores líquidos se utilizan habitualmente para la recolección de bioaerosoles y estos pueden ser valorados mediante inmunoensayo. Su ventaja consiste en que se pueden realizar diferentes ensayos sobre la misma muestra, y sus desventajas radican en que estos dispositivos funcionan a bajos flujos, que las partículas hidrofóbicas pueden recogerse de forma ineficaz, que el líquido suele evaporarse y que se dispone de un número limitado de ensayos para identificar y cuantificar el contenido de la muestra (107).

Los colectores ciclónicos secos acumulan partículas para su posterior análisis mediante diversas técnicas. Sus ventajas son la posibilidad de recuento visual de partículas, cultivo y posterior inmunodetección tras la obtención del eluido. Su desventaja más importante radica en su bajo flujo y en consecuencia, tamaño pequeño de muestra para su análisis (107).

En cuanto a las técnicas de muestreo, para alergenos de exterior, las diferencias radican en el efecto de las variables meteorológicas y de la actividad humana que inciden directamente sobre la captación de estas partículas micrónicas, que difieren de las encontradas en los estudios en los que de forma experimental, se reproduce en el laboratorio la polinización de las *Poaceae* (109).

En el caso de los colectores de alto volumen, se tiene el problema de la utilización de filtros grandes que deben ser subdivididos debido a la necesidad de largo tiempo de extracción y hacen que la muestra se diluya en un rango importante (107).

Los captadores de bajo volumen se han utilizado con menor frecuencia pero ofrecen varias ventajas: los resultados ofrecen una mejor representación de la provocación con alergeno en la población y sus resultados pueden ser comparados con el recuento de polen

volumétrico de forma más sencilla (107). Este aspecto es importante porque el recuento de polen es la fuente estándar de información para los alergólogos y los pacientes (110). También ofrecen menos probabilidades de dañar los granos de polen.

Hasta la fecha no se ha diseñado un dispositivo que de forma satisfactoria aplique las condiciones óptimas de recolección. A esto se añaden las diferencias en las técnicas de muestreo (diferentes protocolos de recogida de muestras), y de inmunodetección de alérgenos, sin contar hasta la fecha con un método estandarizado para la cuantificación de alérgenos de interior ni de exterior, que permitan garantizar la reproductibilidad del mismo, o permitan la comparabilidad entre diferentes estudios (100).

El estudio de partículas micrónicas asociadas a los pólenes, además de ofrecer una explicación a los síntomas de asma de los pacientes con polinosis, ofrece una aportación práctica al complementar la información proporcionada por la monitorización de granos, dado que el recuento tradicional de pólenes no tiene en cuenta su valoración (100).

Dado que con el captador Burkard no se detectan estas partículas micrónicas y su contribución en la clínica de los pacientes es relevante (26), en los últimos 30 años, distintos investigadores se han esforzado en la obtención de la metodología más idónea para la recolección e inmunodetección de estas partículas y de esta manera contribuir en la obtención de métodos estandarizados de monitorización de alérgenos que ofrezcan información útil para la práctica clínica diaria y poder predecir sus efectos sobre la salud y con esta base, instaurar las medidas de prevención/evitación adecuadas. También se intenta determinar las condiciones que favorecen la emisión de estas partículas, y tener más oportunidades de control sobre estos vectores de enfermedad, que constituyen hoy en día la epidemia del siglo XXI (111, 112).

Por lo que se ha discutido anteriormente, el objetivo final de un dispositivo para la recolección/detección de alérgenos, sería el de aportar una técnica reproducible y de rápida cuantificación para aportar datos en tiempo real y de esta manera proporcionar a los profesionales sanitarios y a los pacientes la información necesaria para que se adopten las medidas de prevención/evitación adecuadas en el momento que lo precisen.

8.5.2 Inmunoensayo.

Respecto a los inmunoensayos, para la cuantificación de alérgenos de interior y de exterior, se pueden utilizar diferentes métodos, aunque hasta la fecha, existen pocos trabajos en los que se comparen los diseños de los ensayos (metodología). Hollander A et al, en el año de 1999, comparó los métodos de investigación en tres países, que intercambiaron muestras, Holanda (WAU: Wageningen Agricultural University), Reino Unido (NHLI: Nacional Herat and Lung Institute) y Suecia (NIWL: Natioanal Institute for Working Life) (113). Valoraron los factores que influyen en la detección de los alérgenos y encontraron que el sistema utilizado y la elección de los anticuerpos de detección (Inhibición del RAST, método sándwich con suero policlonal de conejo, y con anticuerpos monoclonales respectivamente), influyen de manera importante sobre los niveles de alérgenos detectados. En este trabajo, los autores recomiendan el uso de anticuerpos estandarizados y caracterizados y extractos estándar de referencia para la técnica de ELISA doble sandwich para la cuantificación de alérgenos.

De forma universal, hoy en día se acepta que la mejor técnica para la detección de alérgenos son las técnicas de ELISA basadas en anticuerpos monoclonales. Para este objetivo, es crucial la producción y el mantenimiento del alérgeno estándar de referencia para la reproducibilidad y fiabilidad de los experimentos. Por ello, una línea de trabajo en la actualidad es la de la comparación de alérgenos purificados y recombinantes (WHO/IUIS Allergen Standardization Committee) e incluir de forma progresiva nuevos protocolos de estudio para obtener métodos sensibles para la cuantificación de partículas micrónicas (114).

En lo que se refiere a pólenes, las partículas micrónicas se escapan de la visualización de las muestras provenientes del recolector Burkard y hasta la fecha, no se ha podido establecer un método de inmunodetección directa, encontrándose en un estudio preliminar, que los halos de inmunodetección de Lol p 5 (que se localiza en los gránulos de almidón), excedían al número del recuento simultáneo de granos de polen, indicando la existencia de una considerable actividad antigénica fuera de los granos de polen (84). En este trabajo también se objetivó una mayor actividad alérgénica que podría corresponder a un número

mayor de partículas micrónicas al final de la estación, que los mismos granos de polen, por su capacidad de permanecer mayor tiempo en el aire que los granos completos. La inmunodetección directa también ofrece la posibilidad de cuantificar con posterioridad el contenido de pólenes vacíos visualizados en días precedentes.

8.5.3 Tabla resumen de algunos estudios.

Existe evidencia sobre la presencia de alergen de pólenes en aerosoles de partículas de menor tamaño que el grano de polen intacto desde 1972, como lo describió Busse et al (3). Estos investigadores utilizaron un impactador tipo Andersen que incorpora un dispositivo para la selección de tamaño de partícula. Los eluidos obtenidos de los filtros de los distintos estratos de partícula, en los que prácticamente se descartaba la presencia de partículas de más de 5 micras, produjeron una respuesta cutánea positiva en sujetos en los que se había realizado transferencia pasiva de suero de pacientes sensibilizados. Estos hallazgos fueron posteriormente validados por las investigaciones de Solomon et al en 1983 (26). A continuación siguieron las investigaciones de Agarwal MC, investigador del equipo la Clínica Mayo, que objetivó la presencia de alergen de Ambrosía asociados a partículas micrónicas antes, durante y después del periodo de polinización y anunció que podrían tener relevancia clínica (22).

En la tabla 11 se resumen algunas de las investigaciones respecto a la cuantificación de alergen en partículas micrónicas (115, 116), pudiéndose observar diferencias en cuanto al tipo de colector utilizado, el plan de recogida de muestras y la técnica de inmunodetección.

	Captador	Plan recogida	Extracción	Inmunodetección	Hallazgos
Agarwal 1 MK 1984 (22)	Accu Vol AV. 0,71 m ³ /min Filtros. Retención partículas (> 0,3 µm	Continuo, 15 días estacional. Ragweed	BCS	Inhibición del RAST	AA antes, durante y después de polinización y en otras partes de la planta

D'Amato G 1994 (117)	CF/Gelaire 30 l/min Filtros Retención partículas (> 0,3 µm	Discontinuo 4 h/d <i>Parietaria</i>	PBS	Inhibición del RAST.	No valorado fuera de estación.
Spiekma FTH 1995 (118)	Ecotech Model 2000 1,13 m3 min-1 Filtros 0,6 micras	Discontinuo <i>Poaceae</i>	PBS	Inhibición del RAST.	AA coincide con el periodo de polinización
Moreno Grau 2006 (73)	Burkard cyclon	Continuo <i>Oleaceae</i> <i>and</i> <i>Urticaceae</i>	PBS	ELISA doble fase	AA durante el periodo de polinización
Cabrera M (120)	GMWS-2310. AV	Air Sentinel Continuo <i>Poaceae</i>	PBS	ELISA inhibición	AA coincide con periodo de polinización, pero también hay actividad fuera de este periodo
Feo Brito F (89)	Air Sentinel	Discontinuo <i>Oleaceae</i>	PBS	ELISA inhibición	AA coincide con periodo de

					polinización, pero también hay actividad fuera de este periodo
Spieksma FTM 1999 (119)	Ecotech Model 2000 1,13 m ³ min ⁻¹ Filtros 0,6 micras	Discontinuo Abedul	PBS	Inhibición del RAST	AA coincide con el periodo de polinización

Tabla 11. Resumen de algunos estudios de cuantificación de aeroalergenos. AA: actividad alérgica.

En Madrid, donde la sensibilización a *Poaceae* es la causa más importante de alergia respiratoria es ésta área (12), Cabrera M et al. demostraron que la cantidad de alergen aerovagantes sigue las fluctuaciones de los recuentos de granos de la estación, pero también con presencia fuera del periodo de álgido de polinización (120). En este estudio, los niveles de aeroalergenos de *Poaceae* en el rango de 1-2 µg/m³ son suficientes para sensibilizar y producir síntomas en pacientes genéticamente predispuestos y fueron similares a los encontrados en otros estudios previos (34, 118). Feo Brito utilizando el mismo colector Air Sentinel y el mismo protocolo de inmunodetección, encontró resultados similares para *Poaceae* y *Oleaceae* (88, 89).

En esta primera experiencia que el equipo del este estudio de Tesis Doctoral realizó en la atmósfera de Madrid, se utilizó un captador de alto volumen denominado Air-Sentinel (HiMec, Inc., Rochester, Minn.) (17) para la cuantificación de aeroalergenos, desde Febrero hasta Diciembre de 1996. Este dispositivo se localizó a 2 m del Burkard. Este aparato funciona a un flujo de 10 m³/h. Las muestras de aire fueron impactadas en filtros de 10x10 cm. Estos filtros consisten en un medio bilaminado que contiene un soporte de poliéster y una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE o teflón, Quan-Tec-Air, Inc., Rochester, MN). Su captación tiene un índice de eficiencia del 99,9% a partir de 0,3 µm

(17). Este aparato realizó muestreos de forma ininterrumpida durante un periodo de 24 horas durante la época de mayor incidencia de pólenes atmosféricos en el área urbana de Madrid (Abril-Junio) y de 72 horas el resto del año. Una vez terminado el tiempo de captación, cada filtro era retirado del aparato y guardado en una bolsa cerrada herméticamente a 4°C. Este aparato está provisto de un registro del volumen de aire recogido, lo que permitió monitorizar su buen funcionamiento muestra a muestra mediante la anotación del valor de volumen de aire aspirado.

Los alérgenos de polen empleados en este estudio eran preparaciones de material alérgico soluble procedente de polen seco (Laboratorios Inmunotek, Madrid; Laboratorios C.B.F Leti, Madrid). La pureza de estos granos de polen se comprobó microscópicamente, sin existir contaminación de otros granos.

El filtro de utilizado en esta primera experiencia, PTFE, ofrece baja resistencia al aire que se está recogiendo y así mismo tiene una retención eficiente de partículas respirables. No denatura, no absorbe los alérgenos, permite un elevado rango de recuperación, y permite la extracción del alérgeno en pequeños volúmenes (1ml o menos), de tal manera que no es necesaria la concentración del extracto. La concentración no sólo añade más costes al ensayo sino que puede causar pérdida de alérgeno, a través de la denaturación o absorción. Estos filtros han demostrado ser un medio adecuado (17).

Durante el proceso de desarrollo y validación de un ensayo para un alérgeno, es importante determinar la estabilidad del mismo en el filtro y la eficacia del procedimiento de extracción. Aunque se han realizado determinaciones rigurosas para unos pocos alérgenos, parece ser que los filtros secos expuestos se pueden almacenar durante varios meses a -20° C sin la pérdida de alérgenos relevantes. Tras la extracción muchos alérgenos son inestables en soluciones acuosas, en parte por su inherente inestabilidad, y en parte por la actividad enzimática de proteasas en la solución. La liofilización es un medio apropiado para estabilizar algunos extractos, pero muchos alérgenos son denaturalizados. Se ha demostrado que es más práctica la extracción de los filtros de PTFE en PBS y guardarlos a -20°. Los estándares de referencia deben ser preparados de la misma manera (17).

Las muestras de sueros utilizadas en este estudio se obtuvieron de pacientes diagnosticados clínica y serológicamente de polinosis con una historia de síntomas estacionales de por lo menos dos estaciones anteriores a la fecha del estudio. Los pacientes procedían de la consulta de Alergia del Hospital Clínico San Carlos y de la Consulta del Centro de Alergia General Pardiñas, ambos localizados dentro del rango de cobertura del captador (10 km). Estos enfermos tenían como residencia el ámbito de ésta área geográfica. Con los sueros de 30 pacientes se realizó un pool compuesto por una cantidad aproximada de 2.5 ml de cada muestra individual (volumen total: 62.5 ml). La IgE total de este pool de sueros era de 476 KU/l y los niveles de IgE específica frente a gramíneas clase 4 (Pharmacia CAP system. Una vez preparada las mezclas, se guardaron en alícuotas a una temperatura de -20°C hasta su uso. Además de realizar la titulación de anticuerpos IgE específicos del pool, se realizó un estudio de reactividad cruzada para asegurar la especificidad del mismo.

En este primer estudio adoptamos un sistema IgE por lo que se obtuvo un pool grande de sueros, de por lo menos 500 ml de cerca de 20 donantes, para asegurar con éste volumen una cantidad suficiente de anticuerpos para completar el estudio a realizar. El sistema IgE tiene la ventaja de asegurar la sustancia que causa la enfermedad cuando la identidad de las moléculas alergénicas es incierta o el material estudiado contiene una mezcla compleja de alergen. Al haber sido el primer estudio en el ámbito de la aerobiología en España respecto a la cuantificación de aeroalergen de exterior, para garantizar de alguna manera su presencia, consideramos favorable poder detectar un mayor número de proteínas alergénicas, teniendo en cuenta que todos los alergen principales contribuyen de alguna forma a la configuración de la potencia global del extracto y que la potencia alergénica de un extracto depende más bien de la concentración de los diferentes alergen principales que de la presencia de un determinado alergen principal (63).

Esto lleva a pensar que los diferentes epítos reconocidos por los anticuerpos IgE se encuentran desigualmente distribuidos en las proteínas del extracto, siendo los alergen principales aquellas proteínas que poseen una mayor densidad de epítos alergénicos y, por esta razón, las que muestran una mayor frecuencia de unión a los anticuerpos IgE. Por consiguiente, los alergen principales no pueden ser entendidos como principios bioquímicos aislados en donde reside la total capacidad para reaccionar con los anticuerpos IgE, sino más bien como proteínas alergénicas en términos estadísticos,

portadoras de un mayor número de epítomos alergénicos. Por otra parte, se ha observado que la relación entre las potencias alergénicas también se mantiene para las fracciones de los extractos alergénicos (65).

La capacidad de inhibición o la potencia alergénica definida por el parámetro del 50% de inhibición, se consideró indicativa de la cantidad de los diferentes epítomos capaces de interferir la unión de los anticuerpos específicos a los componentes del extracto inmovilizado.

El límite de detección para este método en la cuantificación de los alérgenos a estudio fue de 5 ng/ml.

Podemos decir, respecto a este estudio de inhibición de los anticuerpos IgE de pacientes diagnosticados de polinosis por sensibilización a pólenes de gramíneas en el área de Madrid, por un extracto de *Trisetum paniceum* de referencia de gran sensibilidad (en el rango de 5-10 ng/ml de proteína) que permitió su cuantificación en las muestras recogidas, aporta consistencia a la luz de los resultados obtenidos en los tres ensayos realizados en paralelo donde las diferencias interexperimentales fueron menores al 10%. Así, para la curva de inhibición de los anticuerpos IgE establecida, quedaba garantizada su reproductibilidad para ser utilizada en esta investigación.

A partir de esta experiencia, pensamos que la forma más deseable para expresar la concentración de alérgenos sería una proteína estándar purificada para cada alérgeno en cuestión y anticuerpos monoclonales frente al mismo (74, 75, 76, 77, 78), motivo por el cual se decidió cuantificar la carga alergénica en esta segunda oportunidad mediante esta técnica. Los resultados del ensayo pueden ser expresados en términos del contenido proteico de ese extracto de referencia o en términos de alguna unidad arbitraria asignada a la preparación de referencia. Tales ensayos son internamente consistentes dentro de un único experimento, y si la preparación de referencia es estable, los resultados son consistentes, como lo han objetivado el equipo de la Stella Moreno Grau y Maria Suárez Cervera (73), motivo por el cual, en esta segunda experiencia, hemos trabajado con la

metodología del ELISA doble sándwich y utilizamos el Cyclon Burkard para obtener resultados comparables.

Schappi et al. (62) estudiaron la concentración del grupo 5 de alergenios de *Poaceae* (Phl p 5) en pólenes y partículas atmosféricas de rango $< 7,2\mu\text{m}$ y $> 7,2\mu\text{m}$ durante el periodo de polinización de las *Poaceae* en Australia. Encontró que la concentración de este grupo de alergenios en partículas $> 7,2\mu\text{m}$ se correlacionó de forma significativa con el recuento de pólenes. Durante los días secos el 37% de estos se concentra en las partículas mayores mientras que en los días húmedos, un 75% ocurre en las de pequeño tamaño. Se encontró que en los días de lluvia el número de equivalentes de granos de almidón (número hipotético de gránulos basado en el recuento de pólenes y que corresponde 700 gránulos por grano de polen), se incrementa por un factor de 10, observándose un incremento estadísticamente significativo de las asistencias a urgencias por asma con un decalaje de 4 días. Este mismo autor verificó la presencia del alergenio Bet v 1 en los gránulos de almidón (61), cuya concentración se incrementaba en las partículas de menor tamaño de forma significativa en presencia de lluvia ligera, estando los pacientes sensibilizados a mayor riesgo de sufrir una crisis asmática. En este estudio se observa también decalaje entre la presencia de granos y la presencia de alergenios de abedul.

En Granada, de igual manera, utilizando un impactador en cascada que discrimina el tamaño de partícula y que recoge los alergenios en filtros de fibra de vidrio, De Linares C et al., verificó la presencia de Ole e 1 y Lol p 1 mediante técnica de ELISA, encontrando que la presencia de alergenios y de granos de polen siguen una curva similar, excepto en los periodos antes y después del periodo principal de polinización, encontrando para *Oleaceae* la mayor concentración de alergenios en el rango de partícula entre 3.3 y 0,7 micras, indicando que la actividad alérgica se encuentra principalmente en partículas paucimicrónicas (122, 123).

Barnes C et al. (124), demostraron una correlación entre los altos recuentos de pólenes de *Ambrosia sp.* y la actividad alérgica cuantificada, coincidiendo con la presencia de granos de polen, pero también se registraron altos niveles de dicha actividad en ausencia de pólenes en la atmósfera, tal y como otros autores han descrito para la *Ambrosia sp.* (22,

26). Estos investigadores han descrito que la actividad alergénica se correlaciona mejor con los síntomas que con los recuentos de pólenes y encontraron que el pico máximo de actividad alergénica para *Ambrosia sp.* era posterior al respectivo recuento de pólenes. Salomón WR (26) demostró además a través de pruebas cutáneas y estudios *in vitro* que el contenido alergénico de *Ambrosia sp.* en partículas micrónicas es clínicamente relevante.

8.6 Efectos de las variables meteorológicas y de contaminación sobre la presencia de granos de pólenes y de presencia de alergen.

En este estudio, se objetiva que la lluvia, limpia la atmósfera y de aquí la correlación negativa con significación del 95% para PM10 y del 99% para el ozono. La lluvia, es un eficaz instrumento de limpieza de la atmósfera al arrastrar hasta el suelo las partículas biológicas que flotan en las capas altas de la atmósfera.

Durante el periodo de estudio, los meses más húmedos han sido, por este orden: diciembre, enero, noviembre y febrero con humedad media relativa global de 78,5, 76, 74 y 71% respectivamente. Y los más secos, también por este orden: julio, agosto, junio y septiembre, con humedad relativa del 41, 42, 49,5 y 52%.

Respecto a la temperatura, existe una correlación positiva con los granos de pólenes de *Poaceae* y *Phl p 5*: $r: 0,227$ ($p=0001$) y $r: 0,144$ ($p=0,015$), así como con *Ole e 1* ($r: 0,158$, $p=001$), debiéndose fundamentalmente a que la polinización de las plantas está muy vinculada con la temperatura. Al respecto, se ha podido observar en esta línea, que el ascenso térmico, inducido por el cambio climático, está produciendo modificaciones significativas en el inicio de la polinización, objetivándose también que el incremento en los niveles de CO₂ (efecto invernadero) pueden acentuar en el futuro la duración e intensidad de la polinización de las plantas (65).

Respecto a las variables de contaminación se observa una correlación positiva de SO₂ con la presencia de alergen de *Platanaceae*: $r: 0,211$, $p=0001$ y de PM10 con los granos de *Oleaceae*: $r: 0,241$, $p=0001$.

En invierno, como se observa en la Fig. 11, SO₂, CO y benceno constituyen los componentes principales de la contaminación, aunque éstos simplemente sirven como indicadores de mezclas de contaminantes mucho más complejas. Suele corresponder en invierno un incremento de materia particulada, aunque en el periodo de estudio, no se observa esta tendencia. Durante esta estación, la suma de calefacciones, tráfico rodado, industrias, etc. provoca un aumento de la producción de SO₂ y partículas.

Cupressaceae correlaciona positivamente al 99% con SO₂, PM10, benceno y negativamente al 99% con la temperatura. Esto último ocurre por la época de la floración, totalmente invernal, y el incremento positivo coincide con días de inversión térmica. En Madrid las temperaturas de la noche bajan mucho, y por ello la media diaria es baja, de ahí la correlación negativa con la temperatura que no se da en los otros dos tipos polínicos que florecen más adelante en el calendario, las *Poaceae* y *Oleaceae*. Sin embargo, durante la época invernal se dan las condiciones adecuadas para la acumulación de contaminantes como el SO₂ de Madrid, que se origina fundamentalmente en procesos de combustión: calefacción industrial, comercial y en otros procesos industriales.

En situación de inestabilidad atmosférica el viento y la lluvia contribuyen a limpiar la atmósfera y a reducir su concentración. Sin embargo, en situación anticiclónica, es decir, con estancamiento de la atmósfera, al aumento de emisión de estos contaminantes primarios hay que añadir la persistencia de los mismos en el ambiente y por consiguiente el aumento de su concentración.

En invierno, la combinación de niebla intensa, situación anticiclónica y altas concentraciones de contaminantes en los meses fríos del año constituyen los factores comunes del smog de invierno.

Poaceae y *Oleaceae* polinizan en la misma época del año (mayo y junio) y por ello su alto índice de correlación, objetivándose sobre estas un efecto de la temperatura contrario al de *Cupressaceae*. Por otro lado *Poaceae* correlaciona también positivamente y al 99% con la temperatura, pero de forma negativa y al 99% con la humedad. Esto último es esperable por la harmometangia, que consiste que al incrementarse la humedad relativa el grano de

polen gana peso y tiende a sedimentar. Esto igual ocurre para *Oleaceae*. También correlacionan positivamente y al 99% con PM10 y ozono. Las concentraciones de ozono en la época del año de este tipo polínico ya pueden ser algo más altas y lo hacen negativamente y al 99% con el SO₂ (esto mismo ocurre con *Oleaceae*, aunque no alcance significación estadística), observándose un comportamiento diferente a las *Cupressaceae* por la época del año.

En verano, con muchas horas de sol y temperaturas altas, el tipo de contaminación que predomina es la procedente de las reacciones de los hidrocarburos y los óxidos de nitrógeno, estimuladas por la luz solar intensa. El ozono es considerado como el elemento esencial de este tipo de contaminación, como se observa en la Fig. 20. Se trata de un contaminante que suele alcanzar valores mayores en zonas alejadas de los focos emisores, es decir, en zonas semiurbanas y rurales. Las condiciones atmosféricas que están presentes en las olas de calor favorecen extraordinariamente la formación de ozono troposférico a partir de sus precursores. Durante el verano, la superación de la temperatura umbral en Madrid (36,5 °C) coincide con los días en los generalmente se produjo la superación del umbral de aviso a la población por altas concentraciones de ozono, establecido en 180 µg/m³.

De manera indirecta, el aumento de temperatura propio del verano puede asociarse con un incremento de las emisiones de contaminantes por el consumo mayor de energía debido a los sistemas de acondicionamiento de aire y refrigeración de alimentos y otros productos.

En la Comunidad de Madrid, si bien la polinización puede darse desde finales de enero a octubre, dependiendo del tipo de planta o árbol, durante los meses de mayo y junio se produce la polinización de las gramíneas que es, con mucho, la que mayor repercusión tiene entre las personas alérgicas de nuestra Comunidad. Las peculiares condiciones de la atmósfera en primavera, con gran inestabilidad y abundancia de vientos y tiempo revuelto en general, levantan el polen depositado en el suelo, pudiendo desencadenar síntomas (65).

Las correlaciones que presentan CO/SO₂, CO/NO₂, NO₂/CO/PM10 parecen indicar que hay fuentes diferentes que contribuyen a estos contaminantes, por un lado una que aporta monóxido de carbono y dióxido de azufre, otra monóxido de carbono y dióxido de

nitrógeno, y una tercera fuente o situación que incrementa el NO₂, el CO y las partículas (50).

Destaca que cuando aumenta el SO₂ y el CO las partículas bajan. Los incrementos de los tres están relacionados con procesos de combustión (CO, NO₂ y SO₂) y el SO₂ podría tener también otros orígenes industriales. La correlación significativa al 99% pero negativa entre SO₂, CO, NO₂ y benceno con el ozono, es lógica, ya que el ozono es un contaminante secundario, que se origina por reacción entre los precursores, óxidos de nitrógeno y benceno de los que tenemos, en presencia de la radiación solar. Por eso cuando el ozono aumenta decrece el NO₂ y el benceno, como es un oxidante muy fuerte, favorecerá la desaparición de CO y SO₂ que se oxidarán el primero a CO₂ y el segundo a SO₃, para combinarse con el agua para dar ácido sulfúrico, que si se combina con un catión dará un sulfato secundario.

Se observa una correlación positiva y significativa al 99% entre la temperatura con NO₂, PM10 y ozono. El NO₂ también proviene de una reacción, y al aumentar la temperatura se favorece la transformación. El ozono, requiere radiación ultravioleta del sol, por lo que a mayor sea la radiación mayor producción de ozono.

La humedad tiene correlaciones positivas y significativas al 99% con SO₂, CO y benceno, y negativa con el NO₂, PM10 y ozono. Las interacciones serían las mismas para ozono y NO₂, que se han señalado previamente, y contrarias a las de SO₂, CO y benceno. La correlación negativa con las partículas se explica ya que en esas condiciones se incrementa la deposición húmeda.

La transferencia de los alergenios desde los granos de polen al ambiente, natural o contaminado, pueden explicar la presencia atmosférica de actividad alérgica fuera de estación, cuando estos alergenios son secundariamente resuspendidos en el aire por acontecimientos meteorológicos tales como el viento (65). Los factores meteorológicos juegan un papel importante en la presencia atmosférica de los alergenios de *Poaceae* asociados a partículas no dependientes de los granos de polen (65).

La polución atmosférica y el incremento de la temperatura afectan a los árboles y pueden ocasionar un incremento en la cantidad de alérgenos de sus pólenes. Se han encontrado diferencias en la alergenicidad de los pólenes de grupos de árboles de una misma especie y de gramíneas, que aunque vegeten relativamente próximos, se encuentren en zonas con diferente grado de polución (ciudad/campo) o temperatura (valle/montaña) (125).

En este estudio, Armentia A et al (125), llamaron la atención sobre la evidencia de mayor afectación de *Poaceae* en los habitantes de medio urbano 77% de Valladolid que del rural: 22,4%, a pesar de ser tan importante el cultivo de *Poaceae* en esta zona rural. No hay considerables diferencias étnicas, genéticas ni higiénico-sanitarias entre los pacientes del medio rural y urbano de Valladolid. Por ello, estos autores valoraron la hipótesis si el problema no estaría localizado en factores biológicos intrínsecos del propio polen según el lugar donde se desarrolle la planta, más que en la población atópica afectada. Desde el punto de vista de la actividad biológica, las diferencias observadas en el año 1999 no fueron tan importantes como en el año 2000, aunque el polen de la ciudad era un 15% más activo que el polen del área rural. El contenido de Lol p 5 era concordante con la actividad biológica. Su concentración era mayor en el área urbana. En el estudio estadístico realizado para comparar la relación entre parámetros *in vivo* e *in vitro*, se demostró importante relación entre la concentración proteica de cada extracto y las áreas obtenidas en el prick test así como entre la concentración proteica y las UB/mg de polen en los test *in vitro*.

Una posible hipótesis que explicara estos resultados podría ser que las *Poaceae* de las áreas rurales reciben menos daños que las mismas especies en las zonas urbanas, donde el césped está sometido a un ambiente polucionado, siegas repetidas que hacen que muy pocas espigas florezcan y pesticidas aplicados por los ayuntamientos. El continuo daño sobre las plantas puede causar una sobreexpresión de proteínas de estrés en el polen.

Diferentes familias de proteínas de defensa de las plantas (quitinasas de clase I, LTPs, taumatinas e inhibidores de alfa-amilasas) han sido recientemente identificadas y se sabe que se expresan en condiciones de daño de la planta (65). Ya que parece que estas proteínas son alérgenos principales, parece razonable sugerir que el mismo polen puede ser más alérgico en zonas contaminadas que en rurales.

Un incremento del Lol p 5 en el caso del *Lolium* indica la posibilidad de un estímulo de síntesis proteica de alergenios principales del polen urbano frente al rural. Sin embargo, la demostración de que la polución es capaz de estimular proteínas de defensa de los pólenes precisa investigar la inducción de estas proteínas a nivel molecular (RNAm). Este estudio ha demostrado una mayor alergenicidad *in vivo*, medido por las áreas de los prick, de la misma especie de polen recogida en dos lugares diferentes. Los estudios *in vitro* apoyan estos hallazgos. Un menor contenido proteico, alergenicidad (determinada por RAST inhibición) y contenido el Lol p5 por gramo de polen se detectó en los pólenes rurales comparados con los urbanos. Sin embargo, el efecto fue más evidente en las muestras del año 2000 que en las del 1999. Estas diferencias también podrían ser explicadas por las condiciones climáticas de esos dos años: El año 2000 fue más lluvioso y con una temperatura más templada, y también tuvo la mayor concentración polínica (200 granos/m³). Otra posible explicación es que las *Poaceae* urbanas sufrieran algún daño en el año 2000 que no afectara a las *Poaceae* rurales. El único dato que se tiene a este respecto fue la campaña de fumigación del plátano de sombra urbano con antifúngicos durante el año 2000 para combatir una epidemia de grafiosis.

Aunque es posible que la polución juegue un papel en el incremento de la prevalencia de las enfermedades respiratorias alérgicas, otras causas no deben ser subestimadas. Se sugiere que la mayor prevalencia de polinosis en las ciudades puede ser debida a diferencias en su alergenicidad con respecto al rural. Si esto fuera así el paciente polínico que viva en la ciudad no tendría que evitar salidas al campo por temor a una mayor gravedad de los síntomas alérgicos. Por otra parte, habría que tener en cuenta esta diferente alergenicidad en la preparación de extractos útiles para diagnóstico e inmunoterapia.

La polución también puede aumentar la alergenicidad del polen por un efecto directo sobre el propio grano. Ha podido evidenciarse que las partículas procedentes de la combustión del diesel recubren los pólenes recogidos cerca de la autopista (36). Estas partículas pueden tener un efecto adyuvante, tal como lo demostró el grupo de Muranaka de la Universidad de Tokio hace más de 20 años (126), que mediante estudios experimentales en ratones, se observó que la respuesta IgE frente a los alergenios del polen del cedro del Japón se incrementaba de una forma significativa cuando éstos estaban mezclados con partículas

procedentes de la combustión del diesel (36). Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que la prevalencia de fiebre del heno en el medio urbano es el doble con respecto al medio rural, a pesar de que en este último las concentraciones de pólenes son mayores (65). Pero, incluso, dentro del campo también existen diferencias, tal como describen Ishizaki et al. (127), que pudieron observar que la prevalencia de fiebre del heno por cedro japonés entre los campesinos que residían cerca de la autopista, era prácticamente el triple con respecto a los que vivían más lejos de la misma (el 13% frente al 5%).

Más recientemente, Díaz Sánchez et al (128), pudieron comprobar en trece pacientes alérgicos a la Ambrosia, que el incremento de IgE específica, presente en la secreción nasal a los cuatro días de realizarles una provocación nasal con Amb a 1 (alergeno mayoritario de la Ambrosia) mezclado con partículas procedentes de la combustión del diesel, era 16 veces mayor con respecto al incremento producido tras la provocación nasal con el Amb a 1 sin partículas de diesel.

Se tiene evidencia de que las partículas del diesel son capaces de absorber aeroalergenos (Lol p 1) (36), y que actúan como transportadores atmosféricos y prolongan la permanencia de los mismos. En este estudio se verificó además que al ser fagocitadas por los macrófagos y células de la mucosa respiratoria, dan lugar a un incremento en la producción de importantes citocinas inflamatorias y acumulación de eosinófilos en la mucosa respiratoria.

Dadas estas evidencias, existe un potencial de interacción entre los aeroalergenos y partículas aerovagantes del ambiente por lo que el umbral de reactivación frente a los pólenes puede estar también supeditado a los niveles de polución, principalmente la materia particulada procedente de la combustión del diesel, otra variable muy importante a tener en cuenta a la hora de interpretar los recuentos ya que estas pueden aumentar la respuesta en sujetos sensibilizados hasta 27 veces (129, 130).

Recientemente, en nuestro país Feo Brito et al. (131), valoraron la hipótesis de que si la mayor descompensación del asma bronquial en pacientes alérgicos a pólenes de Puertollano (alto nivel de contaminación) con respecto a los de Ciudad Real (bajo nivel de contaminación) podría ser debida al efecto adicional de los contaminantes sobre la

respuesta alérgica al polen. Estas dos ciudades que presentan una vegetación y clima continental ofrece la posibilidad de comparar una similar exposición alérgica a pólenes y unas características socioeconómicas, higiénicas, culturales y genéticas, similares. Esto constituye un buen modelo para analizar el mayor rasgo diferencial, la relación de contaminantes ambientales con la evolución del asma estacional en dos grupos homogéneos de pacientes.

La descompensación no mostró relación estadísticamente significativa con el lugar de residencia ($p=0,130$), (objetivo fundamental del estudio). Además, variables con una $p<0,15$ en el análisis univariante más el lugar de residencia fueron introducidas en un modelo multivariante. De nuevo, la descompensación clínica no mostró relación estadísticamente significativa con el lugar de residencia. Sin embargo sí que se observó una mayor tendencia a la descompensación entre los pacientes de Puertollano 24,2% ($n=16$) frente a los de Ciudad Real 14,1% ($n=10$). Cuando se analiza la relación entre evolución clínica (síntomas y medicación requerida) con los pólenes y contaminantes, se obtienen diferencias entre Ciudad Real y Puertollano, pero sin alcanzar significación estadística. Asimismo, cuando se relacionan los distintos contaminantes y la evolución de los pacientes en ambas ciudades, no se encuentran diferencias significativas ($r^2=0,20$ en Puertollano y $R^2=0,14$ en Ciudad Real). La contribución mayor viene dada por el O_3 , sobre todo en Puertollano, lo que ratifica estudios previos (experimentales y epidemiológicos) que demuestran su vinculación con el incremento de la respuesta alérgica en asmáticos (131).

Con el resto de contaminantes, incluso con SO_2 , que presenta algunos picos elevados en Puertollano en los dos años del estudio, no se observaron diferencias significativas. No es de extrañar esto, pues el SO_2 actúa más como un componente irritativo de las vías aéreas que como amplificador de la respuesta alérgica, tal y como han demostrado estudios epidemiológicos previos llevados a cabo en Alemania del Este y del Oeste antes y después de la reunificación (37).

Quizás sorprenda más que los niveles de partículas (PM_{10}), más elevados en Puertollano, no contribuyan especialmente en la descompensación de pacientes, a pesar del atribuido papel potenciador de la respuesta alérgica. Puede que otros componentes de la contaminación particulada como las partículas diesel o compuestos orgánicos volátiles

como los hidrocarburos aromáticos, que no han podido ser analizados por dificultades técnicas, pudieran arrojar un peso específico mayor en la descompensación del asma IgE-mediado.

En Roma han resaltado el papel del O₃ y las partículas como contaminantes asociados con asistencias a urgencias o ingresos respiratorios debidos a procesos respiratorios y asma (132). Tres resúmenes de resultados del proyecto APHEA (Air Pollution on Health, European Approach) han evaluado la relación entre diversos contaminantes y los ingresos hospitalarios respiratorios totales en seis ciudades (133), y las asistencias a urgencias por asma en cuatro ciudades (134). El hallazgo más consistente para procesos respiratorios y EPOC es la asociación con O₃. La relación con partículas era considerablemente menor que en los trabajos Norteamericanos, mientras que el NO₂ se asociaba con EPOC pero no con los procesos respiratorios globalmente considerados. Los resultados para el asma fueron más controvertidos y menos consistentes, pues se encontró asociación positiva con SO₂ y NO₂ pero no en todos los grupos de edades y ciudades.

En países como China y Europa del este, con elevadas concentraciones de estos contaminantes, la prevalencia de asma es baja y en otras áreas con bajo grado de polución como Nueva Zelanda, la prevalencia de asma es muy elevada, por lo que no habría que descartar otras causas. En estudios experimentales se ha observado que la exposición de *Plh_{eum} pratense* a concentraciones elevadas de SO₂ se asocia a una reducción del alérgeno mayor Phl p 5 lo que no ocurre en presencia de NO₂. Esto podría explicar la menor prevalencia de polinosis en niños de zonas con alta polución de SO₂ comparadas con otras zonas menos contaminadas por esta sustancia (135).

8.7 Perspectivas de futuro

8.7.1 En relación con el conocimiento de las proteínas del propio grano de polen:

- Durante el desarrollo, activación y germinación de los granos de polen, tiene lugar la expresión de diferentes proteínas y glucoproteínas difusibles, relacionadas con el reconocimiento polen-estigma. Muchas de ellas son las responsables de la sensibilización alérgica. El conocimiento de los mecanismos de transferencia de proteínas durante el desarrollo del polen será cada vez más necesario para controlar el enorme abanico de proteínas del polen o de fracciones de la antera que son susceptibles de dispersarse en la atmósfera.
- Encontrar patrones de marcaje de diferentes epítomos de proteínas alérgicas, durante el desarrollo, activación y germinación de los granos de polen, permitirá profundizar en el conocimiento de los mecanismos de liberación de las proteínas difusibles y su incidencia en los procesos de sensibilización, así como en las reacciones cruzadas.
- La investigación en un futuro sobre este tópico podría conducir a métodos de predicción, tales como los asociados con ciertas tormentas que son potencialmente peligrosas para los pacientes asmáticos. A medio plazo las técnicas inmunológicas podrían desplazar el tradicional recuento de pólenes pero este último tendrá por algún tiempo un papel importante para los alergólogos y los pacientes.

8.7.2 En relación con la metodología de extracción y cuantificación de aeroalérgenos:

- En el presente estudio se han podido cuantificar algunos de los aeroalérgenos propuestos, sin embargo, Cup a 1 se ha encontrado por debajo del límite de detección de la técnica. Por ello, el equipo tiene como objetivo volver a extraer los alérgenos ensayando tampones de extracción más potentes, así como realizar estudios de ELISA-inhibición con un pool de sueros con pacientes altamente

sensibilizados, utilizando como extracto de referencia polen de área urbana muy contaminada de Madrid.

- En nuestra opinión, el método de muestreo para la cuantificación de estos alérgenos debe automatizarse, permitiendo la recogida de las muestras por periodos de tiempo iguales, que deben ser diarias para nuestras características aerobiológicas y la metodología propuesta. Además, debemos ampliar el número de aeroalérgenos cuantificados, para poder llegar a una metodología única que permita la cuantificación de los alérgenos más importantes en nuestra área geográfica.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 Se ha puesto en marcha la metodología de muestreo y cuantificación de aeroalérgenos de *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae* y *Cupressaceae* en Madrid. Paralelamente, se han cuantificado los tipos polínicos correspondientes mediante metodologías clásicas de recuento aerobiológico.
- 9.2 Se han obtenido un total de 284 muestras en los años 2009 y 2010 para cada una de las metodologías aplicadas en este estudio.
- 9.3 Se han definido para los tipos polínicos estudiados los parámetros aerobiológicos, con un PPP de 78 días para *Cupressaceae*, 36 días para *Platanaceae*, 131 días para *Poaceae* y 42 días para *Oleaceae*.
- 9.4 Se han encontrado buenos paralelismos entre el comportamiento de los recuentos de los granos de polen y los de aeroalérgenos, excepto para *Platanaceae* en 2010, con el que se ha obtenido un coeficiente de correlación más bajo. La cuantificación de los alérgenos de *Cupressaceae* estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica, probablemente debido a dificultades en la extracción de las proteínas.
- 9.5 La cuantificación del alérgeno suministra una información similar a la aportada por los recuentos tradicionales para *Poaceae*, *Oleaceae*, *Platanaceae*. No se ha puesto de manifiesto la presencia de material alérgico fuera de los periodos de floración. Consideramos por tanto que el grano de polen es el transportador primario de los alérgenos
- 9.6 Se han estudiado las correlaciones entre las concentraciones de los tipos polínicos estudiados y los parámetros meteorológicos y de la red de calidad del aire de la ciudad de Madrid: lluvia, humedad relativa, velocidad del viento, dirección del viento, PM10, O₃, SO₂, NO₂, CO y benceno.
- 9.7 Existe una correlación positiva entre los tipos polínicos de *Cupressaceae*, *Poaceae* y *Oleaceae*, el alérgeno Ole e 1 y las partículas PM10.

9.8 El dióxido de azufre, el monóxido de carbono y el benceno registran en Madrid valores muy inferiores a los valores legislados. Los contaminantes más preocupantes en la ciudad de Madrid son: PM10, NO₂ y O₃.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Gregory PH. The microbiology of the atmosphere. 2nd ed. 377pp. John Wiley and Sons. New York.
2. Solomon WR. Sampling airborne allergens. *Ann Allergy*. 1984 Mar;52(3 Pt 1):140-9.
3. Busse WW, Reed CE, Hoehne JH. Where is the allergic reaction in ragweed asthma? Demonstration of ragweed antigen in airborne particles smaller than pollen. *J Allergy Clin Immunol*. 1972 Nov; 50(5):289-93.
4. Solomon WR. Aerobiology of pollinosis. *J Allergy Clin Immunol*. 1984 Oct; 74(4 pt 1):449-61.
5. Taylor AV, Swanson MC, Jones RT, Vives R, Rodriguez J, Yunginger JW, Crespo JF. Detection and quantitation of raw fish aeroallergens from an open-air fish market. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jan; 105(1 pt 1):166-9.
6. Eggleston PA, Ansari M, Adkinson NF Jr, Wood RA. Environmental challenge studies in laboratory animal allergy. Effect of different airborne allergen concentrations. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Mar; 151(3 pt 1):640-6.
7. De Blay F, Sanchez J, Platts-Mills T, Chapman M, Pauli G. Metrology of airborne particles carrying the principal air allergens. *Rev Mal Respir*. 1995;12(4):343-52.
8. Subiza J, Feo Brito F, Pola J, Moral A, Fernández J, Jerez M, et al. Pólenes alergénicos y polinosis en 12 ciudades españolas. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1998; 13:45-48.
9. Lewis WH, Dixit AB, Wedner HJ. Grass aeropollen of the western United States Gulf Coast. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992; 98(1):80-8.
10. Thibaudon M, Lachasse C. Ambrosia pollen under high surveillance. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*. 2004 Nov; 36(9):337-41.

11. D'Amato G, Spieksma FT, Liccardi G, Jäger S, Russo M, Kontou-Fili K, Nikkels H, Wüthrich B, Bonini S. Pollen-related allergy in Europe. *Allergy*. 1998 Jun;53(6):567-78.
12. Centro, resultados regionales. En: Sastre J y col eds. *Alergológica* 2005, Madrid: SEAIC- Alergia e Inmunología Abelló, 1994: 21-25.
13. J. Subiza, M. Jerez, E. Subiza. Introducción a la aerobiología de las gramíneas *Rev. Esp. Alergol. Inmunol. Clín.* 1992; 7: 151-161.
14. Subiza J, Jerez M. Jimenez JA et al. Allergenic pollen and pollinosis in Madrid. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 96: 15-23.
15. Reed CE. The pathogenesis of asthma. *Med Clin North Am.* 1974 Jan; 58(1):55-63.
16. Mandrioli P, Comtois P, Levizzani V. *Methods in aerobiology*. Ed Pitagora. Bolonia. 1998.
17. Fernández-Caldas E, Swanson MC, Pravda J, Welsh P, Yunginger JW, Reed CE. Immunochemical demonstration of red oak pollen aeroallergens outside the oak pollination season. *Grana* 1989; 28: 205-9.
18. Galán C, Infante F, Ruiz de Clavija R et al. Variación estacional y horaria del polen de *Olea europaea* en la atmósfera de Córdoba en relación con los parámetros meteorológicos. *An Asoc Palinol Leng Esp* 1988, 4: 46-53.
19. Subiza J, Cabrera M, Valdivieso R et al. Seasonal asthma caused by airborne *Platanus* pollen. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 1123-1129.
20. Varela S, Subiza J, Subiza JL et al. *Platanus* pollen as an important cause of pollinosis. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100: 748-54.

21. Reed CE, Swanson M, Li J. Environmental monitoring of protein aeroallergens. In: Bernstein I, Chan Yeung M, Malo JL. Eds: Asthma in the work place. New York, Marcel Dekker, 249-275, 1993.
22. Agarwal MK, Swanson MC, Reed CE, Yunginger JW. Airborne ragweed allergens: association with various particle sizes and short ragweed plant parts. J Allergy Clin Immunol 1984; 74:687-93.
23. Spieksma FThM, Kramps JA, van der Linden AC, et al. Evidence of grass-pollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction. Clin Exp Allergy 1990; 20:273-280.
24. Schappi GF, Suphioglu C, Taylor PhE, Knox RB. Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere. J Allergy Clin Immunol 1997; 100: 656-61.
25. Solomon WR: Uncovering the fine details of pollen allergen transport. J Allergy Clin Immunol 1984; 74:674-677.
26. Solomon WR, Burge HA, Muilenberg ML. Allergen carriage by atmospheric aerosol. I. Ragweed pollen determinants in smaller micronic fractions. J Allergy Clin Immunol 1983; 72: 443-7.
27. Solomon WR, Smets E. Airborne allergens with small particle fractions. Grana 1986; 25:85- 87.
28. Vinckier S et al. The potential role of orbicules as a vector of allergens. Allergy 2001; 56:1129-1136.
29. Subiza J, Subiza JL, Hinojosa M, Varela S, Cabrera M, Marco F. Occupational asthma caused by grass juice. J Allergy Clin Immunol. 1995 Nov;96(5 Pt 1):693-5.

30. Takahashi Y, Sasaki K, Nakamura S, Miki-Hirosige H, Nitta S. Aerodynamic size distribution of the particles emitted from the flowers of allergologically important plants. *Grana* 1995; 34: 45-9.
31. Suphioglu C, Singh MB, Taylor P, Bellomo R, Holmes P, Puy R, Knox RB. Mechanism of grass-pollen-induced asthma. *Lancet*. 1992 Mar 7;339(8793):569-72.
32. Newson R, Strachan D, Archibald E, Emberlin J, Hardaker P, Collier C. Effect of thunderstorms and airborne grass pollen on the incidence of acute asthma in England, 1990-94. *Thorax*. 1997 Aug;52(8):680-5.
33. Higham J, Venables K, Kupek E, Bajekal M, Kopek E. Asthma and thunderstorms: description of an epidemic in general practice in Britain using data from a doctors' deputising service in the UK. *J Epidemiol Community Health*. 1997 Jun;51 (3):233-8.
34. Bellomo R, Gigliotti P, Treloar A, Holmes P, Suphioglu C, Singh MB, Knox B. Two consecutive thunderstorm associated epidemics of asthma in the city of Melbourne. The possible role of rye grass pollen. *Med J Aust*. 1992 Jun 15;156(12):834-7.
35. Venables KM, Allitt U, Collier CG, Emberlin J, Greig JB, Hardaker PJ, Higham JH, Laing-Morton T, Maynard RL, Murray V, Strachan D, Tee RD. Thunderstorm-related asthma--the epidemic of 24/25 June 1994. *Clin Exp Allergy*. 1997. Jul;27(7):725-36.
36. Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JL, Bursill LA. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy*. 1997.
37. von Mutius E, Martinez FO, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Feb; 149(2 pt 1):358-64.
38. Cookson W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 1999 Nov 25; 402(6760 Suppl): B5-11.

39. Howard TO, Meyers DA, Bleecker ER. Mapping susceptibility genes for asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000 Feb; 105(2 pt 2):477-481.
40. Burney PGJ. Evidence for an increase in atopic disease and possible causes. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:484-492.
41. von Mutius E, Fritzsche C, Weiland SK, Roll G, Magnussen H. Prevalence of asthma and allergic disorders among children in united Germany: a descriptive comparison. *Brit Med J* 1992; 305:1395-1399.
42. von Mutius E, Weiland SK, Fritzsche C, Oehme H, Keil U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany. *Lancet*. 1998 Mar 21; 351(9106):862-6.
43. Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J*. 1998 Aug; 12(2):315-35.
44. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J*. 1996 Apr; 9(4):687-95.
45. von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000 Jan; 105(1 Pt 1):9-19.
46. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Aug; 106(2):228-38.
47. Helander ML, Savolainen J, Ahlholm J. Effects of air pollution and other environmental factors on birch pollen allergens. *Allergy* 1997 Dec; 52(12):1207-14.

48. Stirban M, Craciun C, Bathory O, Cipleu O. The effect of atmospheric pollution on *Vitis vinifera* L. pollen ultrastructure under natural conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 1984 Jun;8(3):208-14.
49. Shkarlet OO. Influence of industrial pollution of the atmosphere and soil on the size of pollen grains of the Scots pine. *Soc J Ecol* 1972 Jan-Feb; 3(1):38-41.
50. D'Amato G. Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clin Exp Allergy* 2000 May; 30(5):628-36.
51. Wyler C, Braun-Fahrlander C, Kunzli N, Schindler C, Ackermann-Liebrich U, Perruchoud AP, Leuenberger P, Wuthrich B. Exposure to motor vehicle traffic and allergic sensitization. The Swiss Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults (SAPALDIA) Team. *Epidemiology*. 2000 Jul; 11(4):450-6.
52. Feder WA. Reduction in tobacco pollen germination and tube elongation, induced by low levels of ozone. *Science* 1968 Jun 7; 160(832): 1122.
53. Behrendt H, Becker WM, Fritzsche C, Sliwa-Tomczok W, Tomczok J, Friedrichs KH, Ring J. Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants. *Int Arch Allergy Immunol* 1997 May- Jul; 113(1-3):69-74.
54. Anderson HR, Ponce de Leon A, Bland JM, Bower JS, Emberlin J, Strachan DP. Air pollution, pollens, and daily admissions for asthma in London 1987-92. *Thorax*. 1998 Oct;53(10):842-8.
55. Ado VA, Maksimenko SF. Allergy to chemical (low-molecular) sensitizers. *Farmakol Toksikol* 1973 Jul-Aug; 26(4):494-6.
56. Pehkonen E, Lentimäki R. Sensitivity of IgG-ELISA for detecting airborne pollen antigens of *betulaceae*. *Grana* 1995; 34:350-356.

57. ELISA Competition Assay. Quantitative determination of relative potency of allergenic extracts. Appendix 11. FDA/CBER/DAPP/LIB. 1994.
58. Swanson MC, Agarwal M, Reed CE. An Immunochemical approach to indoor aeroallergen quantitation with a new volumetric air sampler: studies with mite, roach, cat, mouse and guinea pig antigens. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 76: 724-29.
59. Swanson MC, Agarwal M, Yunginger JW, Reed CE. Guinea pig derived allergens. Clinicoimmunologic studies. Characterization, airborne quantification and size distribution. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 844-49.
60. Swanson MC, Bubak ME, Hunt LW, Yunginger JW, Warner MA, Reed CE. Quantification of occupational latex aeroallergens in a medical center. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Sep; 94(3 pt 1):445-51.
61. Schappi GF, Suphioglu C, Taylor PE, Knox RB. Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere. *J Allergy Clin Immunol*. 1997 Nov; 100(5):656-61.
62. Schappi GF, Taylor PE, Pain MC, Cameron PA, Dent AW, Staff IA, Suphioglu C. Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitized to grass pollen allergens. *Clin Exp Allergy*. 1999 May; 29(5):633-41.
63. Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujinzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wuthrich B; EMCI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. A revised nomenclature for allergy. An EMCI position statement from the EMCI nomenclature task force. *Allergy*. 2001 Sep; 56(9):813-24.
64. Gleich GJ, Larson JB, Jones RT, Baer H. Measurement of the potency of allergy extracts by their inhibitory capacities in the radioallergosorbent test. *J Allergy Clin Immunol*. 1974 Mar; 53(3):158-69.

65. Subiza Garrido-Lestache FJ, Pola J, Feo Brito F, Moral de Gregorio AS. Pólenes de interés en alergología en nuestro medio. In: Peláez A, Dávila IJ, eds. Tratado de Alergología. Vol 1. Madrid. Spain: Ergon; 2007: 425-443.
66. Tratado de Inmunología. José Ramón Regueiro González, Carlos López Larrea, Segundo González Rodríguez, Eduardo Martínez Naves. ISBN: 9788498350036. 4ª Edición. Editorial Panamericana.
67. Subiza E. Incidencia de granos de pólenes en la atmósfera de Madrid. Método volumétrico. Allergol et Immunopathol 1980; (suppl VI): 261-76.
68. Hyde HA, Adams KF. An atlas of airborne pollen grains. London: MacMillan, 1958.
69. Andersen, T.B. 1991. A model to predict the beginning of the pollen season. Grana. 30: 269-275.
70. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May 7; 72:248-54.
71. Takahashi Y, Ohashi T, Nagoya T, Sakaguchi M, Yasueda H , Nitta H. Possibility of real-time measurement of an airborne *Cryptomeria japonica* pollen allergen based on the principle of surface plasmon resonance. Aerobiologia 2001; 17: 313-8.
72. Carvalho E, Sindt C, Verdier A, Galan C, O'Donoghue L, Parks S, Thibaudon M. Performance of the Coriolis air sampler, a high-volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains. Aerobiologia 2008; 24:191–201.
73. Moreno-Grau S, Elvira-Rendueles B, Moreno J, García-Sánchez A, Vergara N, Asturias JA, Arilla MC, Ibarrola I, Seoane-Camba JA, Suárez-Cervera M. Correlation between *Olea europaea* and *Parietaria judaica* pollen counts and quantification of their

- major allergens Ole e 1 and Par j 1-Par j 2. Ann Allergy Asthma Immunol. 2006 Jun; 96(6):858-64.
74. Arilla, M.C.; Eraso, E.; Ibarrola, I.; Algorta, J.; Martínez, A y Asturias J.A. Monoclonal antibody-based method for measuring olive pollen major allergen Ole e 1. Ann Allergy Asthma Immunol 2002; 89: 83-89.
 75. Arilla, M.C. ; González-Rioja, R. ; Ibarrola, I. ; Mir, A.; Monteseirín, J.; Conde, J.; Martínez, A. y Asturias, J. A. A sensitive monoclonal antibodybased ELISA to quantify *Parietaria judaica* major allergens, Par j 1 and Par j 2. Clin Exp Allergy 2006; 36(1): 87-93.
 76. Arilla MC, Ibarrola I, Eraso E, Martínez A, Asturias JA. Inmunoensayo para la cuantificación de Dac g 1 en extractos de polen. Alergol Inmunol Clin 2002; 17:231-237.
 77. Arilla MC, Ibarrola I, Mir A, Monteseirín J, Conde J, Martínez A, Asturias JA. Development of a sandwich-type ELISA for measuring Pla a 1, the major allergen of *Platanus acerifolia* pollen. Int Arch Allergy Immunol. 2005 Oct;138(2):127-33.
 78. Arilla MC, Ibarrola I, Martínez A, Asturias JA. Quantification assay for the major allergen of *Cupressus sempervirens* pollen, Cup s 1, by sandwich ELISA. Alergol Immunopathol (Madr). 2004 Nov-Dec; 32(6):319-25.
 79. Jato V, Rodríguez-Rajo FJ, González-Parrado Z, Elvira-Rendueles B, Moreno-Grau S, Vega-Maray A, Fernández-González D, Asturias JA, Suárez-Cervera M. Detection of airborne Par j 1 and Par j 2 allergens in relation to Urticaceae pollen counts in different bioclimatic areas. Ann Allergy Asthma Immunol. 2010 Jul;105(1):50-6.
 80. Moreno Grau S, Angosto JM, Rendueles E, Bayo J, Moreno Clavel J. Effects of meteorological parameters and plant distribution on *Chenopodaciceae*-*Amaranthaceae*, *Quercus* and *Olea* airborne concentrations in the atmosphere of Cartagena (Spain). Aerobiologia 2000; 16: 17-20.

81. Fernández-González D, González-Parrado Z, Vega-Maray AM, Valencia-Barrera RM, Camazón-Izquierdo B, De Nuntiis P, Mandrioli P. Platanus pollen allergen, Pla a 1: quantification in the atmosphere and influence on a sensitizing population. Clin Exp Allergy. 2010 Nov;40(11):1701-8.
82. Subiza J, Masiello JM, Subiza JL, Jerez M, Hinojosa M, Subiza E. Prediction of annual variations in atmospheric concentrations of grass pollen. A method based on meteorological factors and grain crop estimates. Clin Exp Allergy. 1992 May;22(5):540-6.
83. Spiekma FThM, Nikkels AH, Dijkman JH. Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration. Clin Exp Allergy 1995; 25; 234-9.
84. Yli-Panula E, Takahashi Y, Rantio-Lehtimäki A. Comparison of direct immunostaining and electroimmunoassay for analysis of airborne grass-pollen antigens. Allergy 1997; 52:541-546.
85. Acevedo F, Vesterberg O, Bayard C. Visualization and quantification of birch-pollen allergens directly on air-sampling filters. Allergy, Volume 53 (6). June 1998; 594-601
86. Spiekma FT, Nikkels AH. Similarity in seasonal appearance between atmospheric birch-pollen grains and allergen in paucimicronic, size-fractionated ambient aerosol. Allergy. 1999 Mar; 54(3):235-41.
87. Razmovski V, O'Meara TJ, Taylor DJ, Tovey ER. A new method for simultaneous immunodetection and morphologic identification of individual sources of pollen allergens. J Allergy Clin Immunol. 2000 Apr; 105(4):725-31.
88. Feo Brito F, Mur Gimeno P, Carnés J, Fernández-Caldas E, Lara P, Alonso AM, García R, Guerra F. Grass pollen, aeroallergens, and clinical symptoms in Ciudad Real, Spain. J Investig Allergol Clin Immunol. 2010; 20(4):295-302.

89. Feo Brito F, Mur Gimeno P, Carnés J, Martín R, Fernández-Caldas E, Lara P, López-Fidalgo J, Guerra F. *Olea europaea* pollen counts and aeroallergen levels predict clinical symptoms in patients allergic to olive pollen. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2011; 106: 146-152.
90. Subiza J, Feo Brito F, Pola J, Moral A, Bartra J. Alérgenos de exterior. En: Quirce S, Carrillo T, Olaguibel JM, eds. *Asma. Vol I.* Barcelona: MRA ediciones; 2004. p. 187-210.
91. Muñoz M, Subiza J, Gavilán MJ, Barjau C. ¿Es posible establecer una curva dosis-respuesta entre los recuentos de pólenes de gramíneas y síntomas de rinitis? *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 2000; 15:17.
92. Davies RR, Smith IP. Forecasting the start and severity of the hay fever season. *Clin Allergy* 1973; 3:263-267.
93. Florido JF, Delgado PG, de San Pedro BS, Quiralte J, de Saavedra JM, Peralta V, et al. High levels of *Olea europaea* pollen and relation with clinical findings. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119(2):133-137.
94. Feo Brito F, Cárdbaba B, Lahoz C, Subiza J, Jerez M, López G. Oleaceae. En: *Atlas de Aerobiología y polinosis.* Madrid: Lab. Shering-Plough SA, 2000.
95. D'Amato G, De Palma R, Verga A, Martucci P, Liccardi G, Lobefalo G. Antigenic activity of nonpollen parts (leaves and stems) of allergenic plants (*Parietaria judaica* and *Dactylis glomerata*). *Ann Allergy.* 1991 Oct; 67(4):421-4.
96. Vinckier S, Smets E. The potential role of orbicules as a vector of allergens. *Allergy* 2001; 56:1129-1136.

97. Taylor PE, Flagan RC, Valenta R, Glovsky MM. Release of allergens as respirable aerosols: A link between grass pollen and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Jan; 109(1):51-6.
98. Grote M, Valenta R, Reichelt R. Abortive pollen germination: a mechanism of allergen release in birch, alder, and hazel revealed by immunogold electron microscopy. *Allergy Clin Immunol*. 2003 May; 111(5):1017-23.
99. Ahlholm JU, Helander ML, Savolainen J. Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* [Orl.] Hamet-ahti) pollen. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:1384-1388.
100. Chatig M, Nacer J, Burge H, Solomon W. Sampling airborne microorganisms and aeroallergens. Air sampling instruments for evaluation of atmospheric contaminants. 4th ed. Cincinnati; OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 1989.
101. Emberlin J, Plant allergens on pauci-micronic airborne particles. (Editorial): *Clin Exp Allergy* 1995; 25: 202-5.
102. Johnsen C, Weeke E, Nielsen J et al. Aeroallergen analyses and their clinical relevance. I. Sampling by high volume air sampler with immunochemical quantification versus Burkard pollen trap sampling with morphologic quantification. *Allergy* 1992; 47:510-6.
103. Solomon W, Burge H, Boise J, Becker M. Comparative particle recoveries by the retracting rotorod rotoslide, and Burkard spore trap sampling in a compact array. *Int J Biometeor* 1980; 24(2):107-16.
104. Burge HA, Solomon WR, Muilemberg ML. Evaluation of indoor plantings as allergen exposure sources. *J allergy Clin Immunol* 1982; 70:101-8.

105. Cutten AE, Hasnain SM, Segedin BP, et al. The basidiomycete geoderma and asthma: collection, quantitation and immunogenicity of the spores. *NZ Med J* 1988; 101(847 Pt 1):361-3.
106. Luczynska CM, Li Y, Champman MD, Platts Mils TA. Airborne concentration and particle size distribution of allergen derived from domestic cats (*Felis Domesticus*). Measurements using cascade impactor, liquid impinger, and two-site monoclonal antibody assay for Fel d 1. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141:361-7.
107. Cage RC, Schreiber K, Barnes C, Portnoy J. Evaluation of four bioaerosol samplers in the outdoor environment. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996; 77:401-6.
108. Karlsson AS, Renstrom A, Hedrén M, Larlsson K. Comparison of four allergen-sampling methods in conventional and allergy prevention classrooms. *Clin Exp Allergy* 2002; 32:1776-178.
109. D'Amato G, Bonini S, Bousquet J, Durham SR, Platts-Mills TAE. *Pollenosis 2000: global approach*. Naples: JGC Editions, 2001.
110. Jelks ML. Interpretation of pollen counts. *Ann Allergy* 1991; 67:1-2.
111. Champman MD, Tsay A, Vailes LD. Home Allergen monitoring and control-improving clinical Practice and patient benefits. *Allergy* 2001; 56: 604-6.
112. Solomon WR. How ill the wind?. Issues in aeroallergen sampling. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:3-8.
113. Hollander A, Gordon S, Renström A, Thissen J, Doekes G, Larsson PH, Malmberg P, Venables KM, Heederik D. Comparison of methods to assess airborne rat and mouse allergen levels. I. Analysis of air samples. *Allergy*. 1999 Feb; 54(2):142-9.
114. WHO/IUIS Allergen Standardization Committee.
<http://www.allergen.org/standard.php>

115. Pacini E, Franchi GG. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant Syst Evol Suppl* 1993;7:1-11
116. Knox RB. Grass pollen, thunderstorms and asthma. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:354-359.
117. D'Amato G, Gentili M, Russo M, Mistrello G, Saggese M, Liccardi G, Falagiani P. Detection of *Parietaria judaica* airborne allergenic activity: comparison between immunochemical and morphological methods including clinical evaluation. *Clin Exp Allergy*. 1994 Jun; 24(6):566-74.
118. Spieksma FThM, Nikkels AH, Dijkman JH. Seasonal appearance of grass pollen allergen in natural, pauci-micronic aerosol of various size fractions. Relationship with airborne grass pollen concentration. *Clin Exp Allergy* 1995; 25; 234-9.
119. Spieksma FT, Nikkels AH. Similarity in seasonal appearance between atmospheric birch-pollen grains and allergen in paucimicronic, size-fractionated ambient aerosol. *Allergy*. 1999 Mar; 54(3):235-41.
120. Cabrera M, Martínez-Cócera C, Fernández-Caldas E, Carnés Sánchez J, Boluda L, Tejada J, Subiza JL, Jerez M. *Trisetum paniceum* (wild oats) pollen counts and aeroallergens in the ambient air of Madrid, Spain. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Jun; 128(2):123-9.
121. Montero MT, López C, Jiménez JA, Subiza J. Characterization of allergens from *Trisetum paniceum* pollen: an important aeroallergen in Mediterranean continental climatic areas. *Clin Exp Allergy* 1997; 12:1442-1448.
122. De Linares C, Nieto-Lugilde D, Alba F, Díaz de la Guardia C, Galán C, Trigo MM. Detection of airborne allergen (Ole e 1) in relation to *Olea europaea* pollen in S Spain. *Clin Exp Allergy*. 2007 Jan; 37(1):125-32.

123. De Linares C, Díaz de la Guardia C, Nieto Lugilde D, Alba F. Airborne study of grass allergen (Lol p 1) in different-sized particles. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010; 152(1):49-57.
124. Barnes C, Schreiber K, Pacheco F, Landuyt J, Hu F, Portnoy J. Comparison of outdoor allergenic particles and allergen levels. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000 Jan; 84(1):47-54.
125. Armentia A, Lombardero M, Callejo A, Barber D, Martin Gil FJ, Martin-Santos JM, Vega JM, Arranz ML. Is *Lolium* pollen from an urban environment more allergenic than rural pollen?. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2002 Jul-Aug;30(4):218-24.
126. Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Miyamoto T, Ikemori R, Muranaka M. Diesel-exhaust particulates inoculated by the intranasal route have an adjuvant activity for IgE production in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 1987 Apr;79(4):639-45.
127. Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E. Ishizaki T, Koizumi K, Ikemori R, Ishiyama Y, Kushibiki E. Studies of prevalence of Japanese cedar pollinosis among the residents in a densely cultivated area. *Ann Allergy.* 1987 Apr; 58(4):265-70.
128. Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol* 1997; 158:2406-2413.
129. Behrendt H, Becker WM, Friedrichs KH, Darsow U, Tomingas R. Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99: 425-8

130. D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Cazzola M. The role of outdoor air pollution and climatic changes on the rising trends in respiratory allergy. *Respiratory Medicine* 2001; 95: 606-611.
131. Feo Brito F, Mur Gimeno P, Martínez C, Tobías A, Suárez L, Guerra F, Borja JM, Alonso AM. Air pollution and seasonal asthma during the pollen season. A cohort study in Puertollano and Ciudad Real (Spain). *Allergy* 2007 Oct; 62(10):1152-7.
132. Fusco D, Forastiere F, Michelozzi P, Spadea T, Ostro B, Arca M, et al. Air pollution and hospital admissions for respiratory conditions in Rome, Italy. *Eur Respir J* 2001; 17: 1143-1150.
133. Anderson HR, Spix C, Medina S, Schoulen JP, Castellsague J, Rossi G, et al. Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results from the APHEA proyect. *Eur Respir J* 1997; 10: 1064-1071.
134. Sunyer J, Spix C, Quénel P, Ponce-de-Leon A, Ponka A, Barumandzaden T, et al. Urban air pollution and emergency admissions for asthma in four European cities: the APHEA proyect. *Thorax* 1997; 52: 760-765.
135. Clapperton MJ, Reid DM. Effects of sulphur dioxide (SO₂) on growth and flowering of SO₂-tolerant and non-tolerant genotypes of *Phleum pratense*. *Environ Pollut.* 1994; 86(3):251-8.